

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Aneta Marvanová

**Genová exprese vybraných genů v srdci potkana dlouhodobě adaptovaného na chlad
v mírných podmínkách**

**Gene expression of selected genes in heart of long-term cold acclimated rat under
mild conditions**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D

Praha 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 14.8.2015

.....

Aneta Marvanová

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala RNDr. Jitce Žurmanové, PhD. za odborné vedení mé diplomové práce, za trpělivost, za zájem, čas a pomoc, kterou mi po celou dobu věnovala. Děkuji i Mgr. Ivetě Brabcové za pomoc v průběhu celé práce, panu doc. Stanislavu Vybíralovi CSc. za pomoc při adaptaci zvířat, Mgr. Ditě Kašparové za rady a pomoc v metodice PCR a RNDr. Barbaře Elsnicové, PhD. za poskytnutí snímků z transmisní elektronové mikroskopie. Velké díky patří paní laborantce Miladě Slezákové, která asistovala u všech operací. Děkuji celému laboratornímu kolektivu svalové fyziologie, který vytvářel pro mne příjemné prostředí.

Děkuji celé své rodině, Ladislavu Benešovi a přátelům za trpělivost a podporu při vypracovávání této diplomové práce.

Abstrakt

Otužování neboli adaptace na chlad má pozitivní vliv na lidský organismus, který je znám již po desetiletí. Příznivé a negativní účinky závisí na režimu a intenzitě chladové adaptace, a proto je třeba jim věnovat pozornost. U chladové adaptace s nízkými teplotami 0-4 °C u zvířat, bylo prokázáno poškození ledvin a dehydratace organismu. Podle dostupných informací se až do současné doby ještě nikdo nezabýval chladovou adaptací s mírnějšími teplotami a jejím vlivem na molekulární mechanismy srdce. Prvním cílem této práce bylo vytvořit model chladové adaptace, který by nevykazoval negativní vliv na organismus. Druhým cílem bylo stanovit hladiny mRNA vybraných genů v levé komoře myokardu z oblasti důležitých mechanismů spojených s energetickým metabolismem a kardioprotektivními signálními drahami. Výsledky získané na novém modelu chladové adaptace při 10±2 °C neprokázaly negativní změny ani v krvi ani v moči a potvrdily zachování fyziologické bilance tělních tekutin. Ze screeningu mRNA vyplývá, že chronická adaptace může ovlivnit fenotyp srdce, transkripční aktivitu antioxidantního systému a pro-apoptotických genů, tlumí adrenergní signalizaci a moduluje glukózový metabolismus.

Klíčová slova: chladová adaptace, srdce, genová exprese, krev, moč, pitný režim

Abstract

Beneficial effect of hardening or cold adaptation for human health has been known for many decades. Beneficial or detrimental effect depends on the regimen and intensity of the adaptation and thus it is very important to pay attention to them. It has been shown in previous studies that cold adaptation of animals at a low temperature 0-4 °C is accompanied by dehydration and the damage of kidneys. As our best knowledge, the effect of mild cold adaptation on the molecular mechanisms in the heart has not been studied until now. The first aim of this study was to set up a new model of cold adaptation without any negative effects on the organism. The second aim was to assess mRNA levels of selected genes related to the important mechanisms associated with energy metabolism and cardio-protective signaling pathways in the left ventricle. Results obtained using the new model for cold adaptation at 10±2 °C did not show any negative changes in the blood or urine parameters and body fluid balance was maintained. Screening of mRNAs showed that chronic adaptation might affect the phenotype of the heart, transcriptional activity of the antioxidant system and of the pro-apoptotic genes, lowers adrenergic signaling and moderate glucose metabolism in cardiomyocytes.

Key words: cold adaptation, heart, gene expression, blood, urine, drinking regimen

Obsah

Seznam zkratek.....	9
1 Úvod.....	13
2 Literární přehled.....	14
2.1 Současný stav poznání	14
2.2 Hibernace	15
2.3 Mírné terapeutické podchlazení	16
2.4 Tyroidní hormony	17
2.5 Hemodynamické změny vyvolané akutním a chronickým chladem	19
2.6 Otužilci.....	20
2.7 Hnědý tuk.....	20
2.8 Oxidační stres a antioxidační systém	22
2.9 Hormonální a nervové regulace	23
2.10 Chladová adaptace a srdce	24
3 Cíle diplomové práce.....	25
4 Adaptace a metody	26
4.1 Chronická adaptace.....	26
4.2 Metabolická komora	27
4.3 Kanylace arterie carotis communis	28
4.4 Odběr krve a séra	29
4.5 Odběr srdce	29
4.6 Zpracování vzorků	30
4.6.1 Homogenizace vzorků	30
4.6.2 Izolace RNA	30
4.6.3 Měření koncentrace RNA.....	31
4.6.4 Reverzní transkripce	31

4.6.5	Real Time RT-PCR	32
4.7	Statistické hodnocení	33
5	Výsledky	34
5.1	Hmotnostní parametry	34
5.2	Příjem a výdej tekutin a základní vyšetření moči	35
5.2.1	Příjem a výdej tekutin.....	35
5.2.2	Diagnostika moči.....	37
5.3	Krevní obraz a biochemická analýza séra.....	38
5.4	Analýza mRNA transkriptů vybraných genů.....	41
5.4.1	Antioxidační systém	41
5.4.2	Transkripční faktor antioxidantů	43
5.4.3	Zánět	44
5.4.4	Apoptóza.....	45
5.4.5	Adrenergní signalizace	47
5.4.6	Signální molekuly.....	48
5.4.7	Tyroidní hormony a fenotyp srdce	49
5.4.8	Mitochondrie	50
5.4.9	HIF a jeho cílové geny.....	52
5.4.10	Lipidový metabolismus	54
6	Diskuse.....	57
7	Závěr.....	66
8	Internetové zdroje	68
9	Použitá literatura.....	69
10	Přílohová část.....	81
10.1	Přílohová část 1.....	81
10.2	Přílohová část 2.....	85

10.3	Přílohová část 3.....	87
------	-----------------------	----

Seznam zkratek

ACADL	Acyl-KoenzymA-dehydrogenáza
ACER2	Alkalická ceramidáza 2
ACO1	Akonitáza 1
ACO2	Akonitáza 2
ADCY5	Adenylátcykláza 5
ADCY6	Adenylátcykláza 6
ADRB1	Adrenoreceptor beta 1
ADRB2	Adrenoreceptor beta 2
AKT1	Proteinkináza B1
AKT2	Proteinkináza B2
ASA	Kyselina askorbová
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i> , Apoptický signál regulující kináza 1
BAX	<i>BCL2-associated x protein</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/Lymphoma 2</i>
BW	<i>Body weight</i> , tělesná hmotnost
C	Kontrolní skupina
CASP3	Kaspáza 3
CASP8	Kaspáza 8
CAT	Kataláza
CD36	Transportér mastných kyselin
CL	Chladová adaptace 5 týdnů

CLR	Regresní skupina 2 týdny po chladové adaptaci
CRLS	Kardiolipinsyntáza
CS	Citrátsyntáza
CX 43	Konexín 43
DRP1	Dynamin-Related Protein 1
GLUT4	Glukózový transportér typu 4
GPX4	Glutathionperoxidáza 4
GR	Glutathionreduktáza
GSH	Glutathion
GSH-Px	Glutathionperoxidáza
GSK3b	Glykogensyntázakináza
GST	Glutathion-S-transferáza
HIF 2	Hypoxií indukovaný faktor 2
HIF1	Hypoxií indukovaný faktor 1
HK1	Hexokináza 1
HK2	Hexokináza 2
HMOX1	Hemoxygenáza 1
HMOX2	Hemoxygenáza 2
HNE	Hydroxynonenal
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
HW	Hmotnost srdce
LDHA	Laktátdehydrogenáza A

LDHB	Laktátdehydrogenáza B
LV	Levá komora
MAOA	Monoaminoxidáza A
MDM2	<i>MDM2 proto-oncogene</i>
MFN1	Mitofuzín 1
MYH6	Těžký řetězec myozínu alfa
MYH7	Těžký řetězec myozínu beta
NFKB	<i>Nuclear faktor of kappa B</i>
NRF2	Jaderný respirační faktor 2
OPA1	<i>Mitochondrial Dynamin-Like GTPase</i>
P22PHOX	podjednotka NADPH oxidázy
p53	Tumor protein p53
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PKD3	Pyruvátdehydrogenázakináza 3
PDP2	Pyruvátdehydrogenázafosfatáza
PGC1a	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1a</i> , koaktivátor peroxizomální proliferací aktivovaného receptoru gamma 1 α
PKCD	Proteinkináza C δ
PKR	Proteinkináza R
PLA2G2a	Fosfolipáza A2, skupina IIA
PLA2G4a	Fosfolipáza A2, skupina IVA
PLA2G5	Fosfolipáza A2, skupina V
PPAP2a	Kyselá fosfatáza typ 2A

PPARA	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i> , koaktivátor peroxizomální proliferací aktivovaného receptoru alfa
PPRAG	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> , koaktivátor peroxizomální proliferací aktivovaného receptoru gamma
PRKCE	Proteinkináza C ϵ
PRX6	Peroxiredoxín 6
ROS	Volné kyslíkové radikály
RV	Pravá komora
S	Septum
SD	Standardní odchylka
SERCA2	Vápníková atpáza sarkoplazmatického retikula
SMPD2	Sfingomyelinfosfodieteráza 2
SOD Cu	Superoxiddismutáza měďnatá
SOD Mn	Superoxiddismutáza manganová
SPTLC1	Serinpalmitoyltransferáza
TNF α	Tumor nekrotický faktor α
TXRD1	Thioredoxinreduktáza 1
TXRD2	Thioredoxinreduktáza 2
VEGF	Cévní endoteliální růstový faktor A

1 Úvod

Chladová adaptace neboli otužování, které je obvykle navozováno opakovanými expozicemi chladu v dlouhodobějším časovém horizontu, je od pradávna známo jako pozitivně působící intervence na imunitní a vaskulární systém. U kontinuálně adaptovaných zvířat na nízké teploty blízko 0 °C dochází k vzestupu krevního tlaku na hranici mírné hypertenze a rozvoji mírné hypertrofie. Nicméně informace o působení otužování při vyšších teplotách a vliv chladové adaptace na molekulární mechanismy v srdci téměř schází, a až v současné době se setkáváme s ojedinělými pracemi, které se srdcem v tomto smyslu zabývají. Ze starší literatury je patrné, že chladový šok, anebo modely chronické adaptace v nízkých teplotách 0-4 °C, mají nemálo negativních dopadů na oběhový a vylučovací systém. Pravděpodobně z těchto důvodů chladová adaptace nepřitahovala vědce jako potenciálně zajímavý model pro studium kardioprotektivních mechanismů. Na druhé straně na otužilcích byly získány velmi zajímavé výsledky týkající se adrenergní desenzitizace a stimulačního vlivu chladu na tyroidní systém, což by mohlo mít pozitivní vliv na srdce, neboť zvýšený tyroidní vliv byl prokázán jako kardioprotektivní.

Naše předběžné výsledky naznačují, že chladová adaptace v mírnějších podmínkách by mohla posilovat endogenní protektivní mechanismy srdce, které zvyšují jeho odolnost k ischemicko-reperfúznímu poškození. Na základě těchto výsledků, byl vypracován model adaptace při vyšší teplotě (10 °C) a bylo nutné ověřit, zda u tohoto mírnějšího modelu jsou eliminovány negativní dopady působení chronického chladu, které jsou popisované v předchozí literatuře u teplot adaptace 0-4 °C a které by komplikovaly přijmout model jako prospěšný pro celý organismus i srdce. Proto jsme se v této práci, jejímž hlavním cílem je screening exprese vybraných mRNA transkriptů v levé komoře myokardu, také zaměřili na sledování hospodaření s tekutinami v průběhu adaptace a po ní. Dále vyšetření moči, kde by se mohlo projevit případné poškození ledvin a vyšetření základních krevních parametrů.

V této práci nejsou provedena funkční měření srdce ani měření krevního tlaku, protože laboratoř zatím není vybavena pro tato měření na potkanech a budou provedena v následující době.

Tento projekt je podpořen tříletým grantem Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK číslo 188015).

2 Literární přehled

2.1 Současný stav poznání

Používání chladné vody jako léčebného nebo preventivního prostředku je známé pod pojmem vodoléčba, která byla znovuobjevena a popularizována Sebastianem Kneippem a Vincenzem Preisnitzzem v 19. století a její pozitivní účinky jsou využívány dodnes a jsou popsány v knize Kneippova léčebná metoda. Je známo, že střídání tepla a chladu stimuluje hormonální dráhy, povzbuzuje cévní i nervový systém, avšak znalosti o mechanismech tohoto působení na buněčné úrovni jsou velmi sporadické a studované modely jsou velmi heterogenní. U studovaných otužilců se výsledky liší podle sezóny, po akutním vystavení chladu a po odeznívání chladového podnětu (Janský a kol. 1996) popisují, že zlepšená tolerance na chlad může být založená na zvyšující se aktivitě imunitního systému a byla popsána úloha adrenergního systému v termogenezi vyvolané působením akutního chladu na člověka (Šimečková a kol. 2000). Velmi nedávno bylo prokázáno, že i u dospělého člověka dochází k tvorbě aktivní hnědé tukové tkáně již po deseti dnech trvání chladové expozice a podílí se na tvorbě tepla společně s mechanismy třesové termogeneze. Současně byla prokázána velmi mírně zvýšená exprese odpráhuujícího proteinu UCP v mitochondriích kosterního svalu, která však nevyvolala změny v dýchání izolovaných mitochondrií; u srdečního svalu byla prokázána jeho zvýšená exprese pod zvýšeným vlivem tyroidních hormonů (Mattiasson a kol. 2006, Sidossis a kol. 2015). Tyto výsledky přitahují pozornost vědců zvláště v kontextu s metabolickým syndromem a obezitou (Flachs a kol. 2013, Sidossis a kol. 2015, Poher a kol. 2015). Pokud jde o srdeční sval, informace o působení dlouhodobé kontinuální chladové adaptace nebo chronické intermitentní působení chladu na buněčné úrovni, jsou sporadické a až v poslední době se objevují první práce. Z dostupné literatury vyplývá, že odpověď organismu závisí na stupni chladu a době adaptace. Ve většině prací byla aplikována teplota pro adaptaci 4-6 °C a za těchto podmínek byly pozorovány i různé negativní dopady na organismus, kterými se zabývala skupina profesora Freglyho. Pro naše experimenty jsme zvolili vyšší teplotu (10 °C), abychom eliminovali tyto negativní dopady. Navíc naše předběžné výsledky ukázaly výrazné snížení velikosti infarktu po I/R inzultu. Tento náález byl motivací ke

vzniku této práce, která se zabývá popisem základních krevních parametrů a „screeningem“ exprese mRNA v srdci v adaptaci na chlad po dobu 5 týdnů při 10 °C. Práce přináší zajímavé výsledky zvláště ve srovnání se známými kardioprotektivními mechanismy uplatněnými v adaptaci na hypoxii.

2.2 Hibernace

Největší počet prací zabývajících se chladem a srdečním svalem je v souvislosti s hibernací, která se týká zvláštní skupiny živočichů – hibernantů. Hibernace je stav strnulosti, kdy je snížen celotělový metabolismus na minimální hodnotu. Teplota tělního jádra u těchto jinak homoiotermních živočichů výrazně klesá blízko k nule, což významně mění vlastnosti buněčných membrán (Vybíral a Jánský, 1974). Současně bylo zjištěno, že složení membrán u živočichů přežívajících nízké teploty se liší v obsahu cholesterolu a fosfolipidů (Reynolds a kol. 2014). Model hibernace se zásadně liší od adaptace na chlad dlouhodobým a významným poklesem teploty tělního jádra, ke kterému u chladové adaptace nedochází. Dále se liší přítomností mechanismů, které zachovávají buněčné funkce ve velmi nízkých teplotách u hibernantů, a s těmi se u homoiotermních nehibernujících zvířat a u lidí nesetkáváme (Vybíral a Jánský, 1997). I přesto jsou informace z prací na hibernantech velmi cenné. Extrémní podmínky by u nehibernujících savců včetně člověka vedly k fatálním srdečním komplikacím (Drew a kol. 2007). U hibernantů není pozorovaný výskyt maligních arytmií, protože jejich srdce je schopné vykonávat svoji funkci i při tělesné teplotě 0°C (Johansson, 1996). Dosud není vyřešen vnitřní mechanismus ochrany hibernantů před arytmiemi ve snížené tělesné teplotě (Drew a kol. 2007). Hibernace se fyziologicky vyznačuje dramatickým snížením tepové frekvence, dýchání, metabolismu, krevního tlaku, tělesné teploty, a také se snižuje riziko vzniku fibrilací komor (Saitongdee a kol. 2000). Snížení tělesné teploty během hibernace způsobuje zpomalení rychlosti komorového vedení a zvyšuje práh excitace při extrémně nízké tělesné teplotě. Hibernace má pravděpodobně ochranný vliv při fibrilaci komor (Fedorov a kol. 2005). Saitongdee a kol. 2000 uvádějí, že fyziologické změny, které vznikají během hibernace, mohou ovlivňovat funkci a vodivost vodivých spojení na interkalárních discích, které jsou v srdci tvořené převážně konexínem 43 (CX43). Pozorovali vyšší hustotu CX43 v kardiomyocytech u hibernantů. Z těchto výsledků lze usuzovat, že CX43 by mohl hrát důležitou roli i u chladové adaptace a ovlivnit výskyt arytmií.

2.3 Mírné terapeutické podchlazení

Druhou velmi studovanou oblastí v medicíně je mírné terapeutické tkáňové podchlazení na 35-32 °C, které se většinou týká post-ischemických stavů srdeční a mozkové tkáně a má významný protektivní efekt. Zpomaluje nebo zcela zastavuje destruktivní procesy vyvolané ischemií a následnou reperfúzí tkáně, patří mezi ně nadměrná produkce volných radikálů (ROS), excitotoxicita, apoptóza a další (Polderman, 2009). V loňském roce vyšla práce, která porovnávala případy mužů a žen s ischemickými příhodami v průměrném věku 62 let, kteří byli exponováni terapeutické hypotermii vyvolané infúzí 2 litrů fyziologického roztoku o teplotě 4 °C. Snížení tělesné teploty na 33 °C po dobu 24 hodin a následné oteplení o 1 °C na 4-6 hodin vyvolalo u mužů komorové tachykardie a fibrilace, zatímco u žen asystolické epizody. Navíc, u žen došlo k menšímu počtu úmrtí o 54 % než u mužů (Greenberg, 2014). Dále bylo zjištěno, že ženy jsou více náchylné k chladovému šoku a jejich iniciální rytmus začíná v asystole. Zatímco, u mužů byla prokázána vyšší pravděpodobnost komorových tachykardií a vznik fibrilací. Výsledky těchto studií na terapeutické hypotermii přinášejí informace i o buněčných mechanismech, které však nelze přímo využít jako podklad ke studiu chladové adaptace a je třeba je uvažovat pouze jako orientační, neboť při adaptaci nedochází k poklesu teploty tělního jádra. Hypotermie má vliv na prodlužování akčního potenciálu, a také na koncentraci kationtů v srdci, snižuje nekrotická ložiska v myokardu, zvyšuje heterogenitu repolarizace (Piktelakol, 2012).

Ve srovnání s pozitivním efektem klinické hypotermie, se setkáváme s negativním působením akutního chladu v případě náhlých chladových expozic v zimních měsících, anebo u pádů do ledové vody, které způsobují chladový šok. Následkem toho může dojít k srdečním arytmiím, infarktu myokardu a následnému úmrtí (Ronges a kol. 2012). Je otázkou, zda pravidelné otužování snižuje riziko chladového šoku především u lidí v pokročilém věku, kteří jsou jeho následky více ohroženi. Gao a kol. (2012) porovnali skupinu mladých (18-35 let) a starších (55-79 let) lidí po ponoření do studené vody 15 °C na 20 min. Výsledky ukázaly, že chlad zvyšuje požadavek srdce na kyslík více u starších probandů, avšak pouze u mladých jedinců došlo ke zvýšení jeho dodávky. Vazodilatace, a tedy i zvýšené prokrvení srdce, je závislé na věku a s věkem se zhoršuje. U skupiny starších nebyly změněny amplitudy CBV (coronary blood velocity) a CVR (coronary vascular resistance). Krevní tlak byl po expozici mírně zvýšen u mladých lidí ze 115/65 mmHg na 122/71 mmHg a u starších lidí bylo zvýšení krevního tlaku významnější ze

128/73 mmHg na 147/78 mmHg. Tepová frekvence u starších lidí mírně poklesla a u mladých lidí došlo k mírnému zvýšení. Teplota kůže se mírně snížila u obou skupin o 2,5 až 3°C (Gao a kol. 2012).

V devadesátých letech minulého století byla zaměřena pozornost na kardiovaskulární reaktivitu, která byla měřena pomocí chladového testu (tj. ponoření jedné ruky do 4-5 °C studené vody na 1 min, měřen tlak po 15 s) ve spojitosti s hypertenzí. Bylo zjištěno a následně potvrzeno, že lze pomocí výsledků chladového testu rozdělit probandy do dvou skupin normoreaktivní a hyperreaktivní, kdy hyperreaktivní jedinci mají zvýšenou dispozici k hypertenzi nebo jí již trpí (Greenberg, 2014). V této souvislosti se dá uvažovat o pozitivním vlivu chladové adaptace na zmírnění reakce srdce na chladový šok nebo náhlé podchlazení.

2.4 Tyroidní hormony

Chladová adaptace aktivuje tyroidní systém v návaznosti na adrenergní stimulaci. β -adrenergní stimulace zvyšuje aktivitu trijodtyroninu (T3) tím, že aktivuje deionidasy 2 (D2), což propojuje tyto dva systémy (Kim a kol. 2004). Vliv tyroidních hormonů na srdce je všeobecně znám a stále studován. Nedávno, byla obrácena pozornost k tyroidním hormonům jako významného agens v odpovědi srdce na ischemický stres, remodelaci myokardu a potenciálně důležitý prvek v regeneraci srdce po I/R poškození (Pantos a kol. 2012). S ohledem na chladový stres, působení tyroidních hormonů je nezbytné pro aktivaci a formování hnědé tukové tkáně v průběhu chladové adaptace. Působení T3 je realizována přes jaderné receptory, $TR\alpha1$ a $TR\beta1$ což ovlivňuje transkripci genů mnoha procesů živém organismu včetně lipidového a sacharidového metabolismu, plasmatické koncentrace lipidů, koagulace, aktivitu receptorů a jejich signálních drah, zánět, proteolýzu i apoptózu skrze „thyroid hormon responsive element“(TRE) of T3 target genes (Huang a kol. 2008). Byl prokázán i přímý vliv tyroidních hormonů na respiraci mitochondrií (O'Reilly a kol. 1992).

Cílové geny T3 v srdci významně ovlivňují metabolické procesy skrze transkripční koaktivátor pro steroidní a jaderné receptory (PGC-1 alpha) (Wulf a kol. 2008), řídí spřažení excitace a kontrakce skrze stimulaci exprese SERCA a $MyHC\alpha$ (Arnoštová a kol. 2011, Soukup, 2001), dále excitabilitu kardiomyocytu, mitochondriální biogenesi (Wulf a kol. 2008) a respiraci skrze expresi UCP2 (Lanni a kol. 1997).

Analýzy *in situ* hybridizace paraventriculárního jádra hypotalamu ukázaly nárůst počtu neuronů exprimujících TRH mRNA až o dva řády po 64 hodinách po chladové expozici (Fiedler a kol. 2006). Úroveň T3 v srdci je výsledkem rovnováhy mezi dostupností a degradací T3, která je regulována mnoha mechanismy. Zatímco vyšší hladina D1 a D2 zvyšuje hladinu volného T3, vyšší aktivita D3 vede k jeho degradaci. Vedle těchto mechanismů, hladina T3 je ovlivňována příjmem tyroidních hormonů do buněk pomocí membránových transportérů a aktivací TH jaderných receptorů a jejich koaktivátorů (Gerdes a Iervasi 2010). V hypertrofovaném srdci je vysoce exprimovaná D3 fetální izoforma, která způsobuje snížení T3 signální aktivity v srdci. To může vést k rozvoji hypothyroidního fenotypu srdce, se kterým souvisí poškození energetického metabolismu a exprese T3 cílových genů, které úzce souvisí s kontraktilní funkcí kardiomyocytů (Laurberg a kol. 2005, Pol a kol. 2010, Dillmann, 2010). Kromě toho se v současné populaci často setkáváme se subklinickým hypothyroidismem, který negativně ovlivňuje koncentraci lipidů v plasmě a společně s rostoucím věkem zvyšuje významně riziko kardiovaskulárních a mozkových ischemických epizod v souvislosti se zimním ročním obdobím (Bull a Morton 1978, Franklyn a kol. 1993). Obecně závislost výskytu srdečních poruch na sezóně je velmi zajímavé téma, které shrnula ve své dizertační práci Hana Hanzlíková (2015). Ve svém dlouhodobém výzkumu zjistila, že lidský organismus ovlivňují studené a horké vlny. Větší dopad na kardiovaskulární úmrtnost v České republice mají studené vlny v zimním období, které ohrožují nejvíce muže ve středním věku. Během horkých vln v letním období dochází k ischemickým chorobám srdce a jsou více ohroženy ženy, zatímco u studených vln dochází převážně k akutnímu infarktu myokardu (Hanzlíková 2015). Bylo zjištěno, že dochází k sezónnímu kolísání hladiny tyroidních hormonů během roku. Volný T4 v séru měl nejvyšší koncentraci na jaře a nejnižší v létě, stejně tak, volný T3. Avšak celkový T3 byl nejvyšší v zimním období a nejnižší v létě (Levine a kol. 1995). Podobně dochází ke kolísání metabolitů v plazmě. Během zimních měsíců byla u lidí zvýšená viskozita plazmy, viskozita krve, hemoglobin, hematokrit, fibrinogen, kortizol a také cholesterol (Fröhlich a kol. 1997). Chladová adaptace též zasahuje do krevních parametrů, zvýšila v krvi hladinu glukózy, celkový cholesterol, LDL i HDL cholesterol, triglyceridy, lipoprotein A (Marvi a kol. 2001). U pacientů s hypercholesterolaemií, kteří se pravidelně otužovali po dobu 5 týdnů, se snížila hladina LDL cholesterolu v plazmě avšak hladina T3 hormonu se nezměnila (De Lorenzo a kol. 1998). Akutní vystavení chladu zvyšuje koncentraci cholesterolu v plazmě,

fibrinogen a erytrocyty, což přispívá k poklesu objemu plazmy až o 14 % (Nield a kol., 1994). Později ve studiích na prasatech i u lidí byl prokázán stimulační efekt na hladinu T3 (Herpin a kol. 1995, Leppäluoto a kol. 2005). Současně Lesná & Vybíral (2015 v tisku) ukázali u otužilců zvýšený T3 ve fyziologickém rozsahu a snížení poměru ApoB/ApoA v zimním období. Z tohoto důvodu jsme u potkanů adaptovaných po dobu 5 týdnů stanovovali hladinu T3 v séru a komplexní krevní parametry. Domníváme se, že dlouhodobé otužování, neboli adaptace na chlad, by mohlo mít celkově pozitivní přínos v ochraně organismu proti náhlým změnám teplot, zvláště v zimním období.

2.5 Hemodynamické změny vyvolané akutním a chronickým chladem

Kontinuální chronická stejně jako intermitentní (Xing a kol. 2014) adaptace na chlad zvyšuje systolický tlak až do 130-140 mmHg, což jsou hraniční hodnoty hypertenze. Stejně tak v počátečních stádiích zvyšuje srdeční frekvenci a způsobuje hypertrofii 25 %. Tyto nálezy byly získány při poměrně extrémních teplotách 0-4 °C vzduchu, nebo ponořením do vody. Podávání propranololu normalizovalo chladem indukované změny tlaku a tepové frekvence, ale nezměnilo podíl hypertrofie (Sun a kol. 1997). Fregly a kol. (1994) zjistili důležitou úlohu tyroidních hormonů v hypertrofii vyvolané chladem, která může být spojena se zvýšeným metabolickým obratem srdce. Dále bylo zjištěno ve dvacetileté studii na 220 lidech, kterým byla ponořená ruka na 1 minutu do 4 °C vody, že chladová adaptace zvyšuje systolický tlak ze 114 mm Hg na 116 mm Hg, diastolický tlak ze 69 mm Hg na 84 mm Hg a puls ze 72 tepů za minutu na 78 tepů za minutu (Menkes a kol. 1989). V letošním roce se objevila práce Zhao a kol. (2015), která poukazuje na to, že i diastolický tlak je spojen se vznikem hypertenze. Adaptace ponořováním do 10 °C vody snižuje dechovou frekvenci, inspirační objem i srdeční tep. Ale postačuje 14 měsíců k návratu k původním hodnotám u dechové frekvence a inspiračního objemu, zatímco srdeční tep zůstává na stejné hladině jako při adaptaci (Tipton a kol. 2000).

Renální odpověď na akutní chlad byla intenzivně studována skupinou prof. Freglyho v kontextu zvýšení krevního tlaku a srdeční hypertrofie (Fregly a kol. 1982). Autoři zde popsali fenomén tzv. „thermogenic drinking“, který je vyvolán relativní dehydratací v průběhu chladové adaptace. Tento fenomén byl popsán v rozsahu teplot chladové expozice 0-5 °C až po návratu do termoneutrální zóny a projevoval se nadměrným příjmem tekutin. Mechanismus byl zjištěn na úrovni stimulace angiotensinu II signální dráhy skrze β 2-adrenergní receptory (Fregly, 1982). Později bylo ukázáno, že k hypertenzi indukované

chladem přispívají všechny komponenty renin-angiotenzin-aldosteronového systému. Chladová expozice zvyšuje nadměrné ztráty vody, což může vést k potlačení renálních V_2 receptorů s větší pravděpodobností než k inhibici uvolnění ADH (Sun a kol. 2003).

2.6 Otušilci

Výzkum vlivu chladu na lidský organismus má na Přírodovědecké fakultě dlouhodobou tradici. Zasloužili se o to prof. RNDr. Ladislav Jánský, DrCs a doc. RNDr. Stanislav Vybíral, CSs, kteří pracovali zejména s otušilci. Při otužování lidské tělo produkuje více tepla, aby bylo schopno udržet konstantní teplotu jádra (Ji-Qung Xing a kol. 2014). K tomuto procesu je potřeba celá řada fyziologických odpovědí, které vedou ke zvýšené metabolické odpovědi a změně využívání energetických látek. Dochází ke zvyšování krevního tlaku, srdeční frekvence a ke větší spotřebě kyslíku, snižuje se kyselina mléčná. Obecně dochází ke třem typům adaptace a to adaptaci metabolické, izolační a hypotermní (Jánský a kol. 1996). Reakce na chlad je zprostředkována β adrenoreceptory. β_1 a β_2 jsou zodpovědné za zvyšování rychlosti metabolismu a u otušilců, tedy u dlouhodobé adaptace, byl prokázán pokles adrenergní odpovědi, která přes β_2 receptory snížila u otušilců srdeční frekvenci. Dále došlo ke zvýšení kapacity netřesové termogeneze (Jánský a kol. 2008). U otušilců byla prokázána zvýšená koncentrace noradrenalinu v séru, a díky tomu se může měnit intenzita metabolismu (hlavně tedy netřesová termogeneze), i kardiovaskulární funkce. Dále otušilci mají sníženou rektální teplotu a mají posunutý práh termogeneze na nižší tělní teplotu (Jánský a kol. 2008). Dalším typem otužování, o které se zajímali RNDr. Ladislav Jánský a DrCs a doc. RNDr. Stanislav Vybíral, CSs je lokální ochlazování. Při lokálním ochlazování dochází ke snižování srdeční frekvence, systolického tlaku, k snížené produkci noradrenalinu, ke snížení průměrné teploty pokožky a centrální teploty. Lokální ochlazování nemá vliv na hladinu katecholaminů ani na práh termogeneze (Jánský, 2006).

2.7 Hnědý tuk

Velmi brzy po vystavení chladu dochází k rozvoji hnědé tukové tkáně, tzv. hnědnutí růžového tuku. Hnědý tuk je důležitá tkáň, která se v chladové adaptaci podílí na tvorbě tepla a je významnou součástí netřesové termogeneze u malých živočichů a u člověka v raném stádiu vývoje v dospělosti (Sidossis a kol. 2015). U novorozenců se hnědý tuk aktivuje zhruba po 1 hodině od porodu a novorozenec ho významně ztrácí do 8 měsíců (ústní sdělení pana doc. Vybírala) u dospělých jedinců je jeho aktivace stimulovaná

intenzivním stimulem, anebo dlouhodobou adaptací. Hnědý tuk se rozvíjí pod vlivem aktivace adrenergní a tyroidní signalizace a vyznačuje se přítomností velkého množství mitochondrií s vysokým obsahem cytochromu, které způsobují tmavou barvu. Na vnitřní membráně mitochondrií v hnědém tuku se nachází odpřahující protein (UCP). Zvyšování exprese UCP 1 má za následek zvyšování netřesové termogeneze. UCP 1 rozpojuje oxidaci od fosforylace ATP a disipuje elektrochemický gradient protonu na teplo. Exprese UCP je vyvolána různými signálními cestami a to podle toho, zda se jedná o dlouhodobou chladovou adaptaci, nebo jestli se jedná o akutní chlad. Maslov (2015) ve své práci uvádí, že při dlouhodobém chladu je využita signální dráha: katecholamíny, β adrenergní receptory, AC, cAMP, proteinkináza A, p38 kináza, transkripční faktor a následuje zvýšení exprese UCP. Zatímco v akutním chladu: katecholamíny, β adrenergní receptory, adenylátcykláza, cAMP, hormon senzitivní lipáza, volné mastné kyseliny, UCP a následné rozptážení oxidace od fosforylace. Aktivovaný hnědý tuk prochází strukturálními i funkčními změnami, které umožní vysokou produkci tepla, jako energetický zdroj využívá glukózu a mastné kyseliny. Zvýšené energetické nároky jak strukturální, tak i funkční mají za následek změnu metabolismu a energetické produkce v hnědém tuku. Ukazuje se, že v poslední fázi adaptace je zvýšená aktivita jak glykolytických, tak i β -oxidačních enzymů (Vucetic a kol. 2011).

Nejen v mitochondriích hnědého tuku se nacházejí odpřahující proteiny, UCP2 se nachází např. v bílém tuku, v srdci, UCP3 je pouze ve svalech, UCP4 v mozku a UCP5 byl nalezen v bramborách. Během posledních deseti let se vědci zajímají o mechanismus a roli UCP2 a UCP3 na buněčných a zvířecích modelech v ischemiích myokardu a srdečním selhání (Akhmedov a kol. 2015, Safari a kol. 2014). Myši deficientní $-/-$ UCP2 a UCP3 produkují více ROS v srdci během ischemicko-reperfúzního poškození a dochází k poruchám energetického metabolismu srdce a ke zhoršenému obnovení kontraktilní funkce srdce po ischemickém infarktu (Ozcan a kol. 2013). Podobně $-/-$ UCP3 v srdci myši vykazují vyšší tvorbu ROS, apoptózu a větší velikost infarktu (Perrino a kol. 2013). Naproti tomu, zvýšená exprese UCP2 u novorozených kardiomyocytů zabráňuje kolapsu mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) vyvolaného H_2O_2 , dále snižuje vápenaté přetížení a apoptózu (Teshima a kol. 2003). U dospělých kardiomyocytů neměla zvýšená exprese UCP2 žádný vliv (Bodyak a kol. 2007). Zvýšení UCP2 a UCP3 v srdci potkana snížilo velikost infarktu a tvorbu ROS mitochondriemi, díky zvýšené propustnosti membrány pro protony a snížení MMP (McLeod a kol. 2005). Regulace transkripce

různých izoform UCP byla přehledně shrnuta v review Ježekem v roce 2002. Z velmi rozsáhlé variability regulace je zřejmé, že se jedná o velmi složitý proces, do kterého může zasahovat řada transkripčních ko-regulátorů (SP1, AP1, AP2 CREBP, MyoD, a glukokortikoidní receptor). V UCP2 promotoru (84-44 bp) mají vazebná místa PPAR γ , SP1, SRE (sterol regulatory element) a E-box; a promotor 879–839 bp: ARNT a AHR, ARNT a HIF1 α (hypoxic and toxic stimuli), IPF (insulin promotor factor) a Pax6. UCP3 promotor má vazebná místa pro promotor E-box (immunoglobulins and circadian clocks), MyoD, MEF2, PPAR a TH. Samotná aktivita UCP může být inhibována vazbou purinových nucleotidů (GDP, GTP, ADP and ATP) (Modriansky a kol. 1997). Konkrétně u UCP1 v hnědém tuku byla popsána stimulace anionty mastných kyselin vznikající při zvyšující se β -oxidaci a následným zvýšením ROS (Mailloux a kol. 2012, Fedmann a kol. 2009). Pozitivní vliv byl zaznamenán i u produktů lipidové peroxidace (4-HNE) (Sluse, 2012, Echtaý, 2007, Azzu a kol. 2010, Nicholls, 2001).

2.8 Oxidační stres a antioxidační systém

Akutní vystavení chladu vyvolává ve tkáních oxidativní stres a zvýšenou odpověď antioxidačního systému (Kraushik a kol. 2003). Chladné prostředí zvyšuje metabolismus, energetickou spotřebu, ale na druhou stranu zvyšuje i produkci ROS (Xing a kol. 2014), které mohou poškozovat buněčné struktury, peroxidací lipidů, oxidací proteinů a poškození DNA, pokud není dostatečně aktivována antioxidační ochrana. Při stresu vznikají volné kyslíkové radikály (ROS), jako je anion superoxidu ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a radikál hydroxidu ($\cdot OH$) (Yüksel a kol. 2006). Organismus se snaží odpovědět na chlad pomocí metabolických procesů, zvýšeným oběhem, hormonální cestou, ale molekulárními a buněčnými mechanismy, které nejsou dosud zcela známy (Yüksel a kol. 2006). Chronický chlad snižuje oxidační stres, takže přesouvá rovnováhu mezi prooxidanty a antioxidanty (Xing a kol. 2014). Antioxidační systém u savců je velmi komplexní a rozsáhlý, zahrnuje jak enzymatické, tak i neenzymatické mechanismy (Yüksel a Asma, 2006).

Kataláza nebo glutathion reduktáza redukuje peroxid vodíku na vodu. V této reakci se uplatňuje redukovaný glutathion (GSH) jako kosubstrát. Glutathion reduktáza (GR) ovlivňuje regeneraci GSH a redukcí oxidované formy glutathionu (GSSG). Vychytává volné radikály, snižuje disulfidové vazby a udržuje tak proteiny ve funkčním stavu. Další ochrannou látkou je kyselina askorbová (AsA), která ve spolupráci s α -tokoferolem působí

jako prevence v peroxidaci lipidů. Glutathion transferáza je hlavním detoxikačním enzymem v cytosolu a v mitochondriích (Yüksel a kol. 2006). Detoxikace produktů, které vznikají při peroxidaci lipidů, katalyzuje enzym glutathion S-transferáza (Kraushik a kol. 2003). Hladina exprese GST je rozhodujícím faktorem v konečné citlivosti buňky na stresové podmínky, dále pak v citlivosti léků užívaných v léčbě rakoviny, na karcinogeny a na škodlivé látky z prostředí (Yüksel a kol. 2006). To k jaké změně dojde v antioxidačním systému, záleží na fyziologických a patologických podmínkách (Kraushik a kol. 2003).

Vedle glutathionového systému má v srdci velkou antioxidační funkci thioredoxinový systém, v jehož centru stojí thioredoxinreduktáza (TXRD). Její hlavní funkcí je regenerovat oxidovaný thioredoxin (TXR) za přítomnosti $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Redukovaný thioredoxin poté může zpětně redukovat oxidované proteiny a regenerovat peroxiredoxiny, které přímo odbourávají peroxid vodíku. TXRD stejně jako TXR mají dvě základní izoformy TXRD1, TXR1 se nacházejí v cytoplasmě, v jádře a TXRD2, TXR2 v mitochondriích (Ahsan a kol. 2009).

2.9 Hormonální a nervové regulace

Hypotalamus integruje přicházející signály o odlišné teplotě z různých částí těla a podílí se na termoregulační odpovědi organismu (Yüksel a kol. 2006). Noradrenalin, serotonin a dopamin hrají důležitou roli v udržování homeostázy, a zaujímají i funkci v termoregulaci. První experimenty provedly Feldberg a Myers (1963, 1964), kteří zjistili, že serotonin hraje roli v produkci tepla a že noradrenalin v hypotalamu reguluje ztrátu tepla. Pozdější práce Scotta a Boulanta (1984), ukazuje, že dopamin má inhibiční vliv na senzitivní neurony v preoptické oblasti. Chladová expozice ovlivňuje expresi Fos proteinů v některých oblastech hypotalamu, v preoptické oblasti, ve ventromediálním hypotalamu a v posteriorním hypotalamu. Preoptická oblast aktivuje mechanismy, které vedou ke ztrátám tepla, v případě zvýšené teploty, ale na druhé straně při ochlazení vyvolává produkci tepla. Posteriorní hypotalamus hraje důležitou roli v třesové termogenezi a studie zaměřené na roli ventromediálního hypotalamu ukázaly jeho roli v netřesové termogenezi v hnědém tuku. Fos proteiny se tedy podílejí na termoregulaci a buňky, které je exprimují, jsou závislé na době působení chladu. Proto se neurální aktivita v hypotalamu mění podle délky chladové expozice, avšak odpověď se lokálně liší. V preoptické oblasti dochází k snížení exprese Fos proteinů během vystavení chladu na několik hodin. Naopak v posteriorním hypotalamu byl vysoký nárůst jejich exprese, která po čtrnácti dnech klesla

na stejnou úroveň jako u kontrol a u ventromediálního hypotalamu po čtrnácti dnech exprese Fos byla zvýšená (Saito a kol. 2005). Z uvedeného vyplývá, že odpověď organismu na akutní a chronický chlad je řízena z různých oblastí a aktivace molekulárních mechanismů se může lišit. Analýzy adenylátcyklázy (ADCY) v periferních tkáních od počátku adaptace ukázaly její zvýšenou aktivitu během prvního týdne a následný progresivní pokles až ke kontrolní hladině, která byla dosažena po třetím týdnu adaptace. Tato data společně naznačují, že v průběhu 4 týdnů je stimulována v hypotalamu adrenergní odpověď na chlad, ale v periferních tkáních dochází k down-regulaci těchto signálů, tedy k desenzitizaci. To je potvrzeno nálezy na lidech (Janský a kol. 2008), které ukázaly snížení odpovědi β_1 , β_2 adrenergních receptorů při podání noradrenalinu u otužilců v zimní sezóně ve srovnání s kontrolami.

2.10 Chladová adaptace a srdce

Jediná práce, která se srdcem v chladové adaptaci u savců zabývá, je práce Ji-Qung Xing a kol. 2014. Xing zjistil na potkanech, že průběh chladové adaptace můžeme rozdělit na dvě fáze, které se liší v různorodosti enzymů i komponentů. První fáze se označuje jako chladová stimulace a druhá jako chladová adaptace. Chladová stimulace probíhá tři týdny a je charakterizovatelná produkcí tepla v játrech a v kosterních svalech. Dochází k zvýšení hladiny katecholaminů, k zvýšení aktivity adenylátcyklázy a fosfodiesterázy. Tuková kináza je aktivovaná k posílení lipolýzy katalýzou ATP v cAMP. Volné mastné kyseliny slouží v této fázi jako substrát pro oxidační fosforylace. Chladová adaptace probíhá následující tři týdny, kdy produkce tepla v játrech a v kosterních svalech se snižuje, ale začíná se zvyšovat enzymatická aktivita v hnědém tuku. V hnědém tuku také dochází k zvýšené produkci tepla, která je regulovaná nervovým systémem. Dochází k aktivaci antioxidačního systému. Zvyšuje se aktivita katalázy (CAT), superoxiddismutázy (SOD) v srdci, kosterním svalstvu, v ledvinách a v játrech (Selman a kol. 2000).

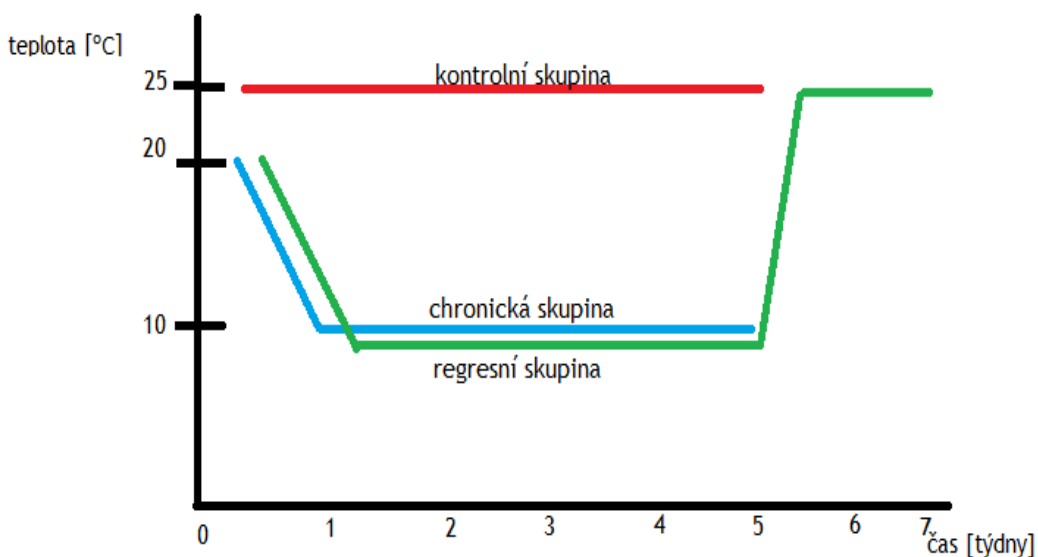
3 Cíle diplomové práce

1. Stanovit krevní parametry, příjem a výdej tekutin, a případné poškození ledvin u chladově adaptovaných potkanů po dobu 5 týdnů (10 ± 2 °C) a po následné 2 týdenní regresi (25 ± 2 °C)
2. Stanovit hladiny vybraných mRNA transkriptů v levé komoře srdeční u chronické adaptace 5 týdnů a po 2 týdenní regresi

4 Adaptace a metody

4.1 Chronická adaptace

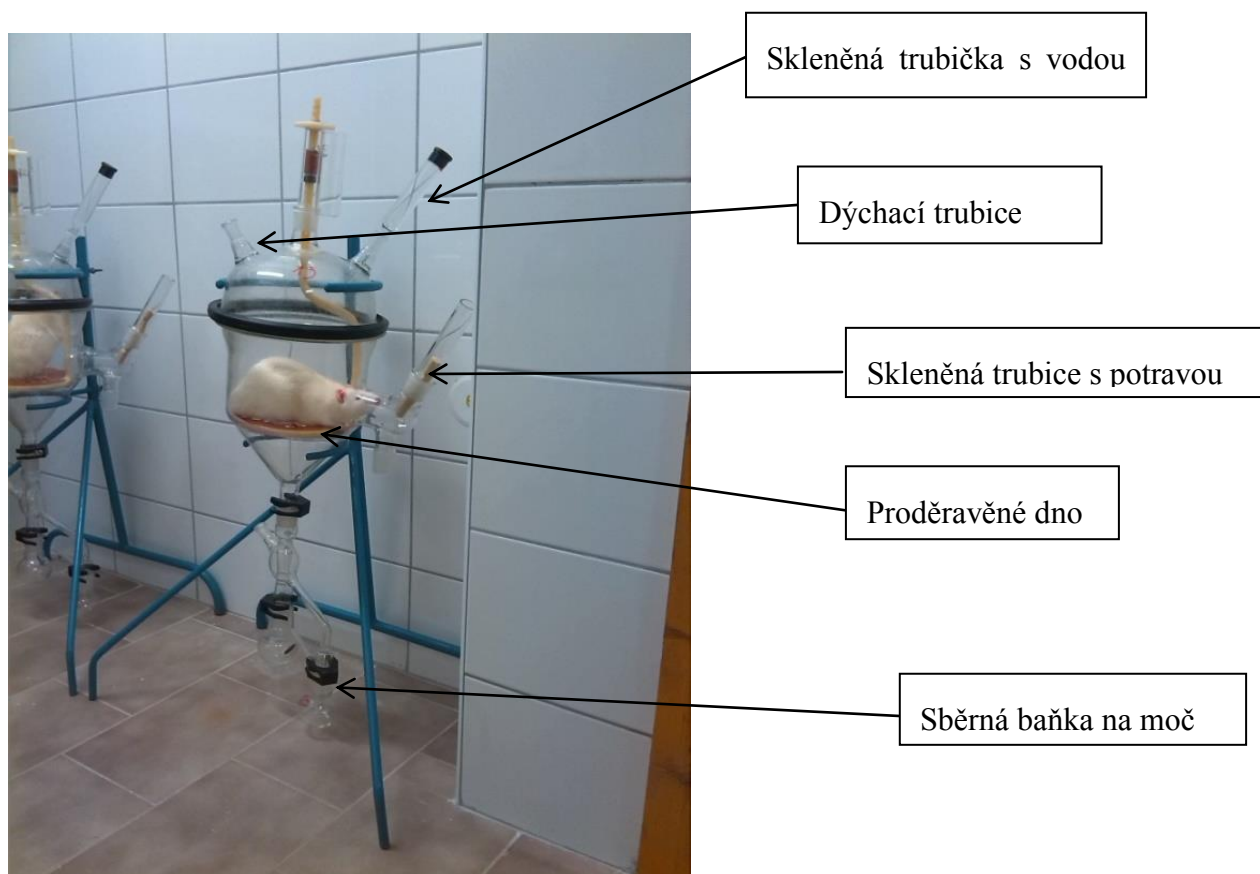
Pro celou práci byli použiti potkaní samci kmene Wistar, chovné jádro Charles River (Velaz s.r.o.) s hmotností 250 ± 1 g. Potkani byli v experimentu rozděleni do tří skupin následovně: kontrolní, chronická a regresní skupina. Kontrolní skupina byla chována v místnosti s pokojovou teplotou 25 ± 1 °C. Chronická a regresní skupina byla chována v oddělené místnosti od kontrolní skupiny a byla postupně adaptována pomalým snižováním teploty v průběhu jednoho týdne na 10 ± 1 °C, ve které setrvala po dobu 5 týdnů. Regresní skupina byla po této době přemístěná z chladové místnosti do teplové, kde byla chována 2 týdny ve stejné teplotě jako skupina kontrolní. Časový průběh chronické adaptace dokumentuje obr.1. Všechna zvířata byla krmena standardní dietou ST1 a chována ve světelném režimu 12/12 s neomezeným přístupem ke stravě i vodě. Potkani byli adaptováni během prosince 2014.



Obrázek 1: Časový průběh chronické adaptace

4.2 Metabolická komora

Ve druhé polovině průběhu chronické adaptace byli potkani průběžně umísťováni na 24 hod do metabolické komory (obr.2). Metabolická komora byla nainstalována v adaptačních místnostech. Potkan byl přemístěn do skleněné nádoby. V $\frac{3}{4}$ skleněné nádoby je proděravěné dno, na kterém potkan stál a odkud volně protékala moč do sběrné skleněné baňky. Skleněná nádoba byla uzavřena skleněným víkem, ve kterém jsou 3 skleněné trubice. Jedna trubice byla určena pro přívod kyslíku, druhou byla dostupná potrava a poslední sloužila pro vodu. Na skleněné trubici pro vodu byla vždy udělaná ryska, pro měření objemu vypité vody. Byly použity dva typy pítka, pítka s širším otvorem (voda při doteku spontánně tvoří kapky) a pítka s užším otvorem (voda odkápne pouze při dotyku a netvoří volně kapku u ústí pítko), které vyžadovalo aktivní přístup k pití. Byla zachována standardní dieta S1, světelný režim 12/12. Po 24 hod bylo změřeno množství vyloučené moče odměrným válcem a proveden základní rozbor moči pomocí diagnostických proužků Multi 10 UrineScreen (obr.3).



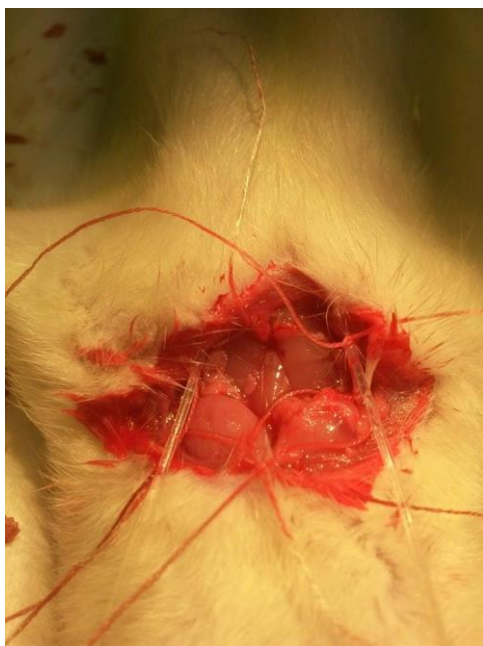
Obrázek 2: Metabolická komora



Obrázek 3: Diagnostické proužky

4.3 Kanylace arterie carotis communis

Potkanům byla podána nejprve peritoneální anestézie thiopentalu v dávce 100 mg na kg tělesné váhy. Po nástupu účinku anestezie byl potkan zvážen a fixován v dorzální poloze a byla provedena kanylace levé, případně pravé arterie carotis (obr.4). Kanyla, o vnějším průměru 0,96 mm, vnitřním průměru kanyly činil 0,58 mm od firmy Smiths medical, byla naplněna roztokem heparinu a dostatečně upevněna dvěma podvazy. Na proximálním konci byla umístěná svorka. V tomto stavu byla artérie připravena pro odběr krve. Po uvolnění svorky krev volně odtékala kanylou do flakonek.



Obrázek 4: Kanylace arterie carotis communis

4.4 Odběr krve a séra

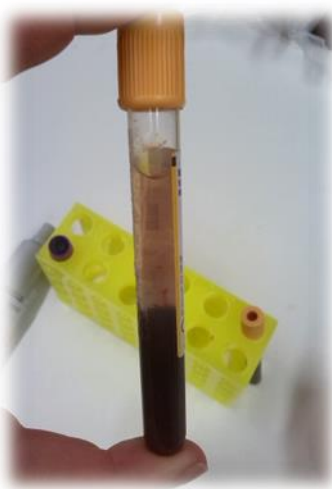
Krev byla odebrána v objemu 1ml krve do připravené zkumavky s obsahem K_3EDTA (firma: Vacuette). Po odběru byla zkumavka 8x pomalu převrácená a ponechána při laboratorní teplotě. Krev byla transportovaná do 5 hodin při teplotě 15-25 °C do laboratoře hematologie ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady.

Odběr séra pro biochemické stanovení byl proveden stejným způsobem jako u krevního obrazu. Ale bylo odebráno 5 ml krve. Zkumavka s krví byla 5x převrácená, byla postavena na 20 min při pokojové teplotě, poté stočená 3500 x g po dobu 15 min a nakonec bylo odebráno sérum do alikvotní zkumavky a zamrazeno v -20 °C (obr.5).

A)



B)



C)



Obrázek 5: Odběr séra: Odběr séra: zkumavka s krví (A), stočená krev (B), sérum v alikvotní zkumavce (C)

4.5 Odběr srdce

Srdce bylo vyjmuto z hrudníku potkana ihned po odběru krve. Bylo ponořeno do vychlazeného fyziologického roztoku na ledu, ve kterém byla odstraněna zbylá krev. Dále bylo poté rozstříháno na ledu na jednotlivé části: levou komoru (LV), pravou komoru (RV) a septum (S), které byly následně zváženy. Části byly ponořeny do tekutého dusíku a zamraženy (-196 °C). Levá komora byla použita pro metodu Real-Time RT-PCR analýze. Přehled hmotnostních parametrů srdcí je uveden v Příloze 1, tabulka 1 - 2.

Po odběru srdce byla odebrána tuková tkáň v oblasti krční páteře a mezi lopatkami a byla poskytnuta panu Dr. Drahotovi.

4.6 Zpracování vzorků

4.6.1 Homogenizace vzorků

Vzorky byly homogenizovány za sterilních podmínek a při zachování nízké teploty, aby nedošlo k rozmražení tkáně. Před vlastním zpracování vzorků bylo zapotřebí připravit 1,5 ml plastové mikrozkušavky, které obsahovaly 3 velké a 3 malé skleněné kuličky a 1 ml RNAzolu. Připravené plastové mikrozkušavky byly chlazené na ledu a zváženy na analytických vahách s přesností na tři desetinná místa.

V izolované místnosti s digestoří byla připravená polystyrenová krabička s tekutým dusíkem, do které se dal vychladit tlouček s třecí miskou, pinzeta a špachtle. Do takto vychlazené misky byla dána část levé komory a následně byla rozdrcená. Utřená tkáň byla přenesena do připravených plastových mikrozkušavek s 1 ml RNAzolu a 6 kuličkami, plastové mikrozkušavky byly rychle protřepány, krátce centrifugovány a následně zváženy na analytických vahách s přesností na desetinu mg a opět umístěny na led. Pro izolaci RNA z levé komory je zapotřebí 80-120 µg tkáně (Příloha 1, tabulka 3).

Plastové mikrozkušavky s tkání byly umístěny do vychlazených kyvet, homogenizovány na homogenizátoru MIXER MIM200, Restch 10 minut při frekvenci 30 Hz. V dalším kroku byla tkáň centrifugována ve vychlazené centrifuze na 4°C při 11000 x g, 10 minut a poté bylo do nových označených 2 ml plastových mikrozkušavek odebráno 1 ml supernatantu, který se využívá pro izolaci RNA.

4.6.2 Izolace RNA

K připravenému supernatantu ve 2 ml plastových mikrozkušavkách byla přidána injekční voda o objemu 400 µl, mikrozkušavka byla dynamicky promíchána rukou po dobu 15 s. Voda užívaná pro PCR je ultračistá dvakrát klávkovaná miliporQ voda nebo injekční voda. Dále byla mikrozkušavka inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí 15 minut byla mikrozkušavka zcentrifugována při 12000 x g, 15 minut. Po centrifugaci byl odebrán 1ml supernatantu do nové 2 ml mikrozkušavky a bylo přidáno 1000 µl neředěného isopropanolu. Mikrozkušavka byla pomalým protočením promíchána,

inkubována při pokojové teplotě 15 minut. Následovala centrifugace při 12000 x g, 10 minut. V mikrozkuřavkách po centrifugaci vznikl sediment tzv. jazýček a supernatant. Supernatant byl odebrán a mikrozkuřavka byla vykapána. K jazýčku, který zůstal v mikrozkuřavce bylo přidáno 400-500 μ l 75 % etanolu kvůli pročištění vzorku. Mikrozkuřavka byla lehce promíchána, zcentrifugována při 8000 x g, 1-3 minuty. Od vzniklé sraženiny, byl odebrán etanol do sucha a čištění s etanolem bylo opakováno ještě 2krát. Ke sraženině bylo přidáno 200 μ l injekční vody, promícháno špičkou a zahříváno na 55-60 °C 15 minut, aby se RNA rozpustila. Poté byly vzorečky rychle dány na led a chladly 10 minut. Z takto připravených vzorků byla měřena koncentrace RNA.

4.6.3 Měření koncentrace RNA

Do nových mikrozkuřavek bylo přidáno 9 μ l injekční vody a 1 μ l vzorku izolované RNA. Roztok byl analyzován na spektrofotometru (Nanodrop) proti injekční vodě jako blanku. Poměr absorbance mezi 260 a 280 nm se využívá jako měřítko čistoty. Tento poměr by se měl pohybovat mezi 2,0 - 2,2 pro čistou RNA. Výsledky z měření koncentrace byly použity jako vstupní hodnoty pro reverzní transkripci. Příloha 1, tabulka 4 ukazuje koncentrační měření RNA u zimní chronické adaptace 2014.

4.6.4 Reverzní transkripce

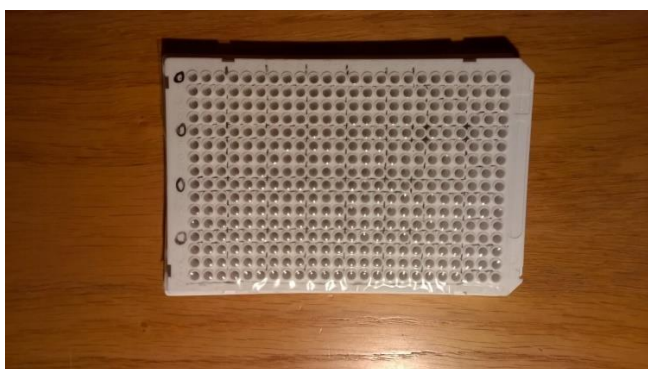
Při reverzní transkripci dochází k převedení RNA na cDNA, která je pak využita k PCR analýze. Do reakce vstupuje 1 μ g RNA. Ze zjištěné koncentrace RNA z Nanodropu byla vypočítána. V Příloze 1, tabulka 4 jsou zaneseny výsledky tohoto výpočtu. RNA byla ředěná do objemu 6 μ l. K takto upravené RNA byl přidán 1 μ l oligo (dT)₁₈, inkubován v 65 °C 5 minut a poté schlazen na ledu. Reverzní transkripce se provádí u všech vzorků najednou s použitím společného pufru s obsahem 5,4 μ l injekční vody, 4 μ l 5x koncentrovaného reakčníhopufu, 2 μ l 10 Nm dNTP mix, 0,8 μ l H-Minus a 0,8 μ l RiboLock RNase Inhibitor (premix), což zaručuje stejné podmínky pro reakci. Ke každému vzorku se tedy přidá 7,9 μ l premixu, uzavřené vzorky vložíme do Thermo-cykleru a proběhne teplotní inkubace při 42 °C po dobu 60 minut, v průběhu inkubace dochází k denaturaci, nasednutí primerů ze směsi a specifické amplifikaci daného úseku, kdy s každým cyklem roste exponenciálně počet specifických kopií. Po inkubaci je zvýšena teplota na 70 °C po dobu 5 minut a následuje ochlazení na 4 °C.

4.6.5 Real Time RT-PCR

Principem Real Time PCR metody je sledovat průběh polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí fluorescenčních sond nebo barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity.

Reakce probíhala v objemu 10 μ l. Jednotlivé reakční jamky obsahovaly 5 μ l Sybr Green I (Bio-Rad), 3 μ l injekční vody a 1 μ l primeru (R+F), což bylo předem smíseno pro každý primer (dále premix) a 1 μ l příslušné cDNA. Byly použity 384 jamkové destičky a Light Cycler [®] 480 (Roche Applied Scienc). Teplotní profil byl následující: Primery byly navrženy pomocí systému UPL Roche dodány firmou Eurogentec, efektivita každého páru primerů byla testována. Přijatelné rozmezí efektivity je 1,8-2,2 (Pfaffl, 2001). Po každé analýze byla hodnocena křivka tání produktů

Pro každý primer byla změřena třibodová kalibrační křivka s ředěním desítkovou soustavou a negativní kontrola (NTC). Do každé jamky bylo nanášeno 9 μ l příslušného premixu a 1 μ l cDNA, nebo kalibrační křivky, či negativní kontroly. Destička po napipetování byla přikryta krycí folií (obr.6), která chránila vzorky před odpařením. Takto připravená destička byla vložena do termo-cykleru Light Cycler [®] 480 Real-Time PCR, kde proběhla samotná PCR reakce. Reakce probíhala podle protokolu: preinkubace 10 minut při teplotě 95 °C s následnými 50 cykly s teplotním profilem 95 °C 10 s, 60 °C 30 s a 72 °C 1 s a následným shlazením na 40 °C.



Obrázek 6: 10 μ l jamková destička překrytá krycí folií

4.7 Statistické hodnocení

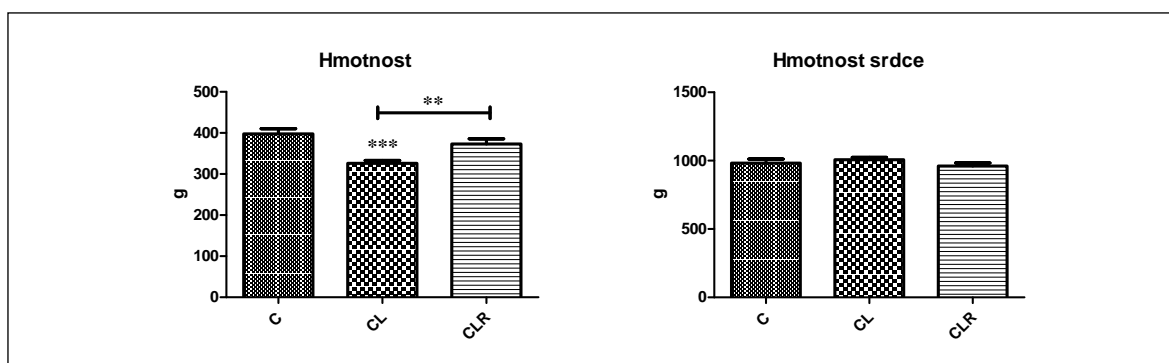
Získaná data byla statisticky hodnocena neparametrickým Mann-Whitney T-testem, pokud se jednalo o porovnávání mezi 2 skupinami, anebo jednocestnou Anovou v případě porovnávání 3 skupin v programu GraphPad Prism 5. Za statisticky významná byla považována data pokud $p < 0,05$.

5 Výsledky

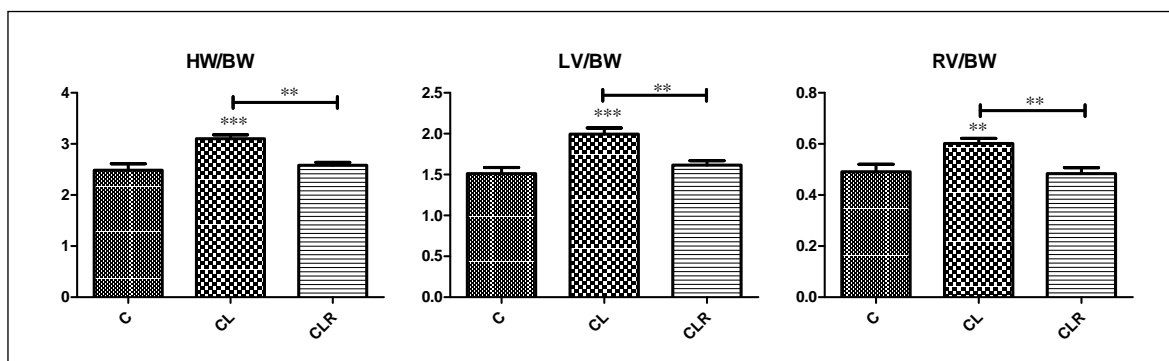
5.1 Hmotnostní parametry

Stanovení hmotnosti těla ukázalo, že kontrolní skupina přibírala na váze více než skupina potkanů adaptovaných na chlad v průběhu 5 týdnů (obr.7). Dále byla zjištěná 25 % reverzibilní hypertrofie (obr.8).

Hmotnostní parametry srdce u zimní adaptace na chlad po dobu 5 týdnů (CL) a následné dvoutýdenní regrese (CLR) (obr.7, Příloha 2, tabulka 1-3), ukázaly signifikantní nárůst levého srdečního indexu (LV/BW, obr.8, Příloha 2, tabulka 2), který je patrně způsoben poklesem tělesné hmotnosti.



Obrázek 7: Tělesná hmotnost a hmotnost srdcí u chladově adaptovaných potkanů po dobu 5 týdnů (CL), u dvoutýdenní regrese (CLR) a u kontrolní skupiny (C).



Obrázek 8: Srdeční index (HW/BW), levý (LV/BW) a pravý (RV/BW) srdeční index u chladově adaptovaných potkanů po dobu 5 týdnů (CL), u dvoutýdenní regrese (CLR) a u kontrolní skupiny (C).

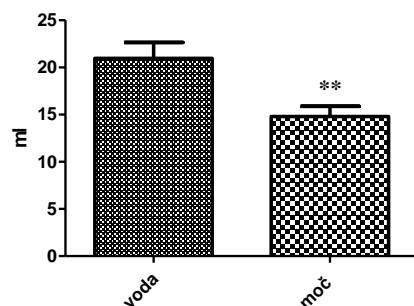
5.2 Příjem a výdej tekutin a základní vyšetření moči

V této podkapitole jsou shrnuty výsledky příjmu tekutin za 24 hodin z dobře dostupného zdroje a ze zdroje se zhoršenou dostupností, což by mělo ukázat touhu zvířat po vodě v jednotlivých skupinách. Tyto výsledky jsou porovnávány s produkcí moče a poukazují tak na celkovou bilanci tekutin. Hlavním cílem bylo zjistit, zda dochází během adaptace k dehydrataci, jak se uvádí v literatuře u vyššího stupně chladu. Dalším cílem bylo zjistit, jestli po návratu do teplého prostředí dojde k fenoménu tzv. „thermogenic drinking“, který souvisí s dehydratací a vede k rychlému doplnění tekutin (viz Literární přehled str.19). V této části je zahrnuta i analýza moči pomocí diagnostických proužků, která měla ukázat, zda dochází či nedochází k poškozování ledvin.

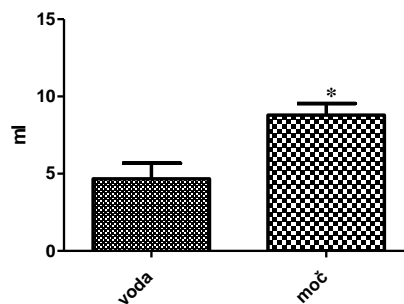
5.2.1 Příjem a výdej tekutin

Při analýze výsledků pitného režimu bylo zjištěno, že potkani, kteří byli adaptováni na chlad po dobu pěti týdnů, pijí méně než kontrolní potkani a vylučují více moči. Kontrolní skupina vypila při neomezené dostupnosti vody $21 \pm 6,5$ ml a vyloučila $15 \pm 4,2$ ml moči (obr.9, Příloha 3, tabulka 1). Kontrolní skupina při omezených podmínkách vypila $4,6 \pm 2,7$ ml a vyloučila $8,79 \pm 2,0$ ml moči (obr.9, Příloha 3, tabulka 2). Adaptovaní potkani průměrně pili 20 ± 9 ml vody denně a vyloučili 26 ± 10 ml moči (obr.10, Příloha 3, tabulka 3). A při ztížené dostupnosti vody adaptovaní potkani vypili $1,6 \pm 2,2$ ml vody denně a vyloučili $9,1 \pm 2,8$ ml moči (obr.10, Příloha 3, tabulka 4). Při ověřování fenoménu „thermogenic drinking“ byly zjištěny tyto hodnoty při normální dostupnosti vody, vypili $16 \pm 6,0$ ml vody za 24 hodin a vyloučili $19 \pm 5,1$ ml moči (obr.11, Příloha 3, tabulka 5) a při omezené dostupnosti vody, potkani vypili $3 \pm 1,7$ ml vody za 24 hodin a vyloučili $6,8 \pm 0,8$ ml moči (obr.11, Příloha 3, tabulka 6). Bilance tekutin vyjádřená poměrem přijaté vody a vyloučené moči ukázala snížení v chladu i regresi u neomezeného přístupu k vodě, avšak u omezeného přístupu k vodě se hodnoty poměru nelišily vzhledem k příslušné kontrole i vzhledem k relevantním skupinám s neomezeným přístupem. Ovšem lišily se vzhledem ke kontrole s neomezeným přístupem k vodě (obr.12, Příloha 3, tabulka 7).

A)

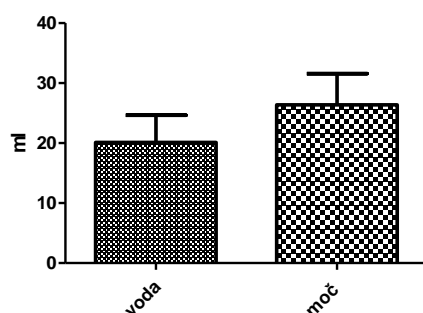


B)

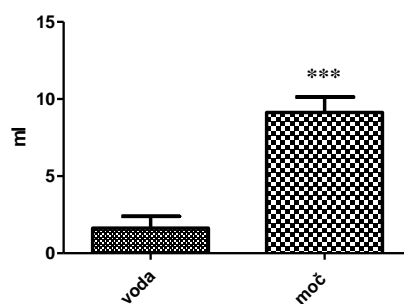


Obrázek 9: Množství vypité vody a množství vyloučené moči při normální A) a omezené B) dostupnosti vody u kontrolní skupiny. Statisticky hodnoceno s použitím Mann-Whitney testu, (* $p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi množstvím vypité vody a vyloučené moči.

A)

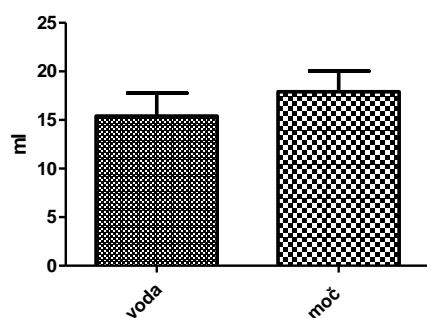


B)

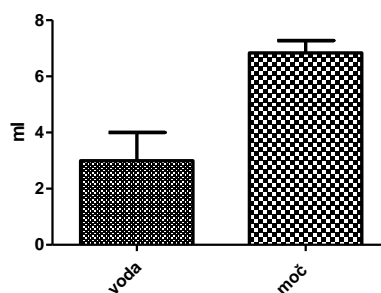


Obrázek 10: Množství vypité vody a množství vyloučené moči při normální A) a omezené B) dostupnosti vody u chronické skupiny. Statisticky hodnoceno s použitím Mann-Whitney testu, (***) $p < 0,001$) signifikantní rozdíl mezi množstvím vypité vody a vyloučené moči.

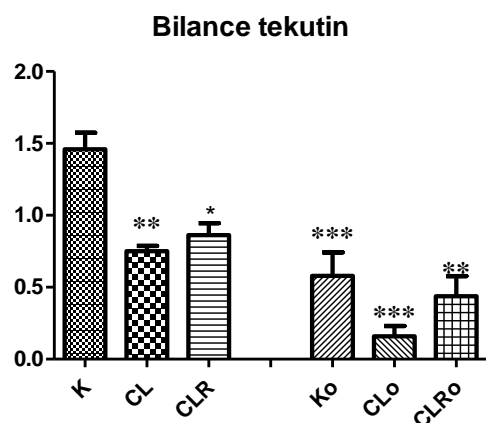
A)



B)



Obrázek 11: Množství vypité vody a množství vyloučené moči při normální A) a při omezené B) dostupnosti vody u chronické skupiny, která byla přemístěna na 1 den do tepla. Statisticky hodnoceno s použitím Mann-Whitney testu, ($p < 0,05$).



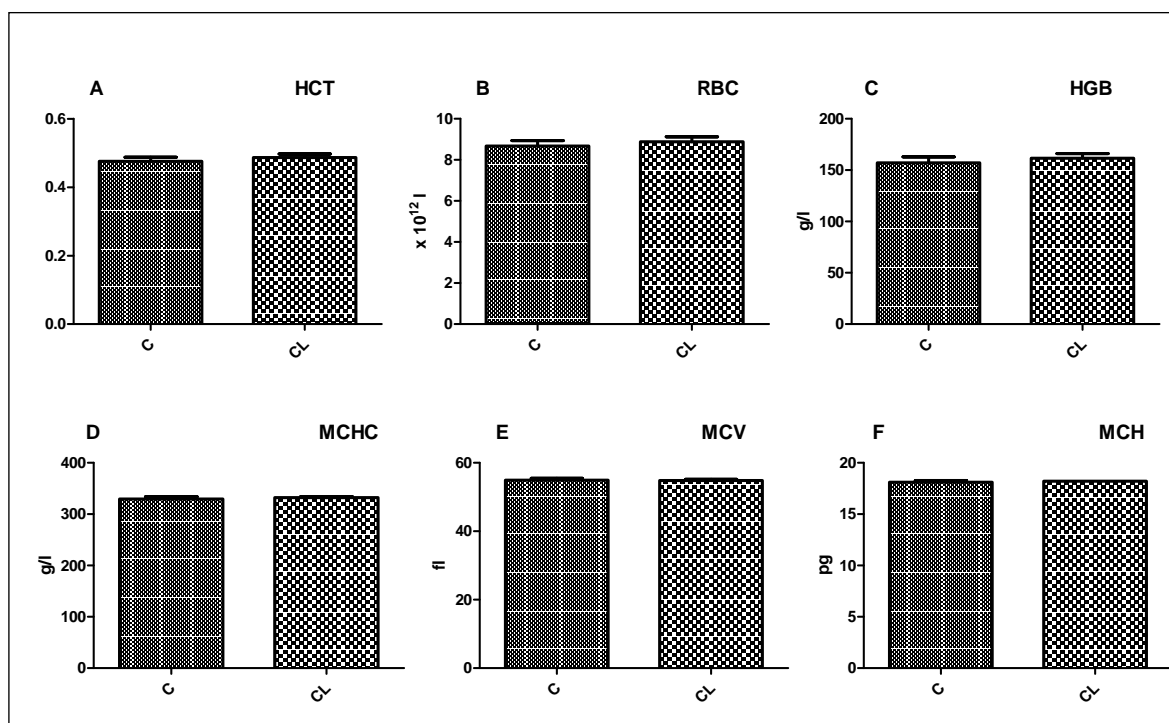
Obrázek 12: Poměr přijatých tekutina vyloučené moči při normální a omezené dostupnosti vody u kontrolní skupiny (K, Ko) u chronické skupiny (CL, CLo) a u jednodenní regrese (CLR, CLRo). Statisticky hodnoceno s použitím ANOVA a posthoc Tukey test, (** $p < 0,001$ vs K), (** $p < 0,01$ vs K), (* $p < 0,05$ vs K) signifikantní rozdíl mezi množstvím vypité vody a vyloučené moči.

5.2.2 Diagnostika moči

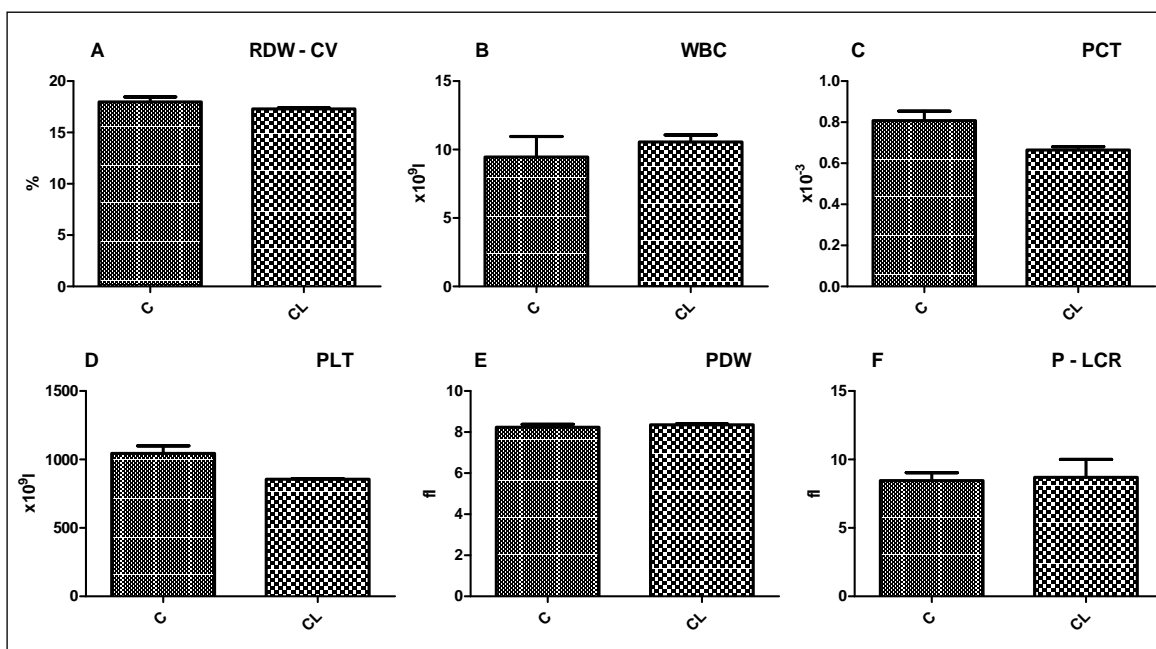
U většiny potkanů nebyly nalezeny nestandardní hodnoty v moči. Pět kontrolních potkanů mělo zvýšenou hodnotu dusitanů. A jeden, opět kontrolní potkan měl větší množství krve v moči a zvýšené množství bílkovin 30 mg/dl. Celková tabulka výsledků je uvedena v Příloze 3, tabulka 8a-8b.

5.3 Krevní obraz a biochemická analýza séra

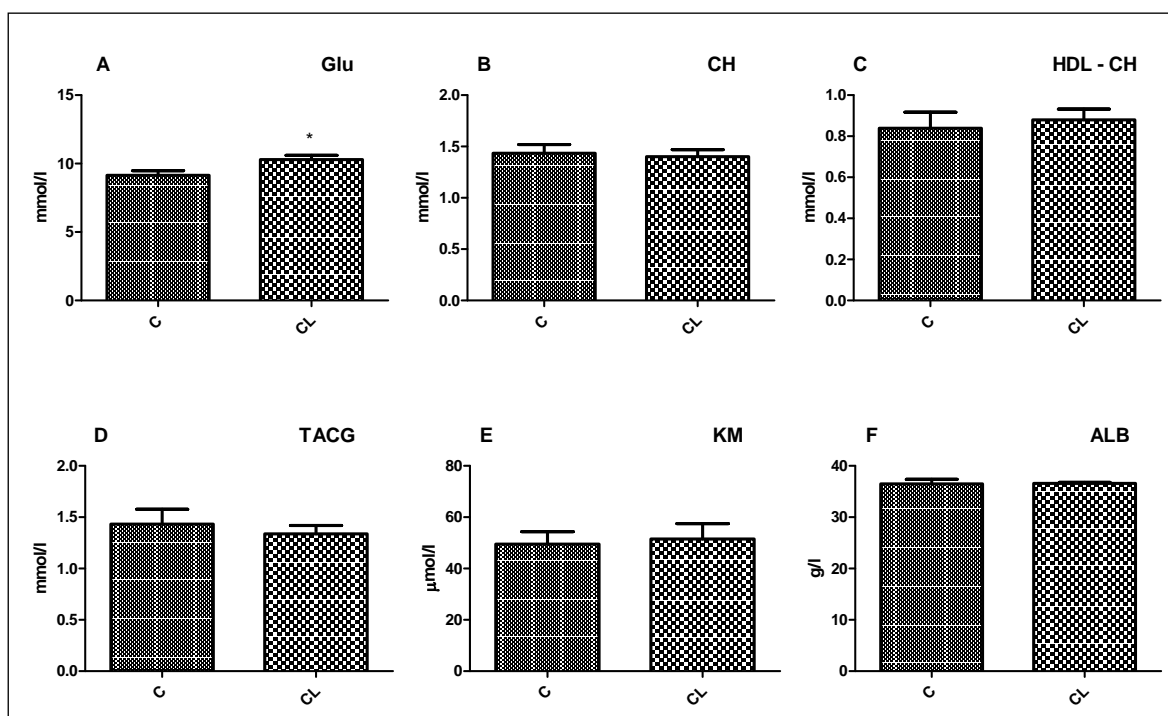
Cílem této analýzy bylo zjistit, zda dochází během chladové adaptace ke změnám v krvi. Při analýze krevního obrazu (n=6) nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou adaptovanou na chlad po dobu 5 týdnů. Při analýze séra (n=4) bylo signifikantní zvýšení u glukózy o 12,6 % oproti kontrole a u ostatních položek nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl. Pozorujeme trend ke zvýšení volného trijodtyroninu v séru a trend ke snížení trombokritu a trombocytů v adaptované skupině.



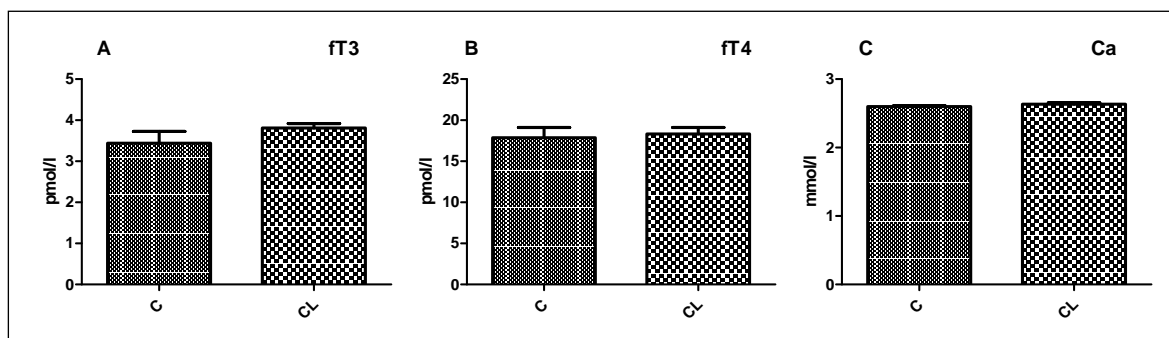
Obrázek 12: Krevní obraz u chladově adaptovaného potkana (5 týdnů), n=4; C (kontrola), CL (chronická skupina) hematokrit (HCT; A), erytrocyty (RBC; B), hemoglobin (HGB; C), střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC; D), střední objem erytrocytů (MCV; E), střední množství hemoglobinu v erytrocytech (MCH; F).



Obrázek 13: Krevní obraz u chladově adaptovaného potkana (5 týdnů), n=4; C (kontrola), CL (chronická skupina) distribuční šíře erytrocytů (RDW-CV; A), leukocyty (WBC; B), trombokrit (PCT; C), trombocyty (PLT; D) distribuční šíře trombocytů (PDW; E), poměr velkých destiček (P-LCR; F).



Obrázek 14: Analýza séra u chladově adaptovaného potkana (5 týdnů), n=6; C (kontrola), CL (chronická skupina) glukóza (Glu; A), cholesterol (CH; B), HDL-cholesterol (HDL-CH; C), triacylglyceroly (TACG; D), kyselina močová (KM; E), albumin (ALB; F).



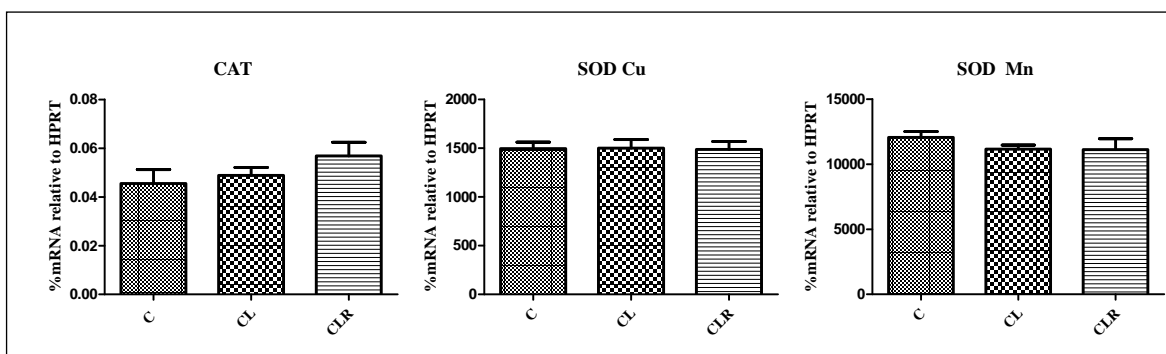
Obrázek 15: Analýza séra u chladově adaptovaného potkana (5 týdnů), n=6; C (kontrola), CL (chronická skupina) trijodtyronin volný v séru (fT3; A), tyroxin volný v séru (fT4; B), vápenaté ionty (Ca; C).

5.4 Analýza mRNA transkriptů vybraných genů

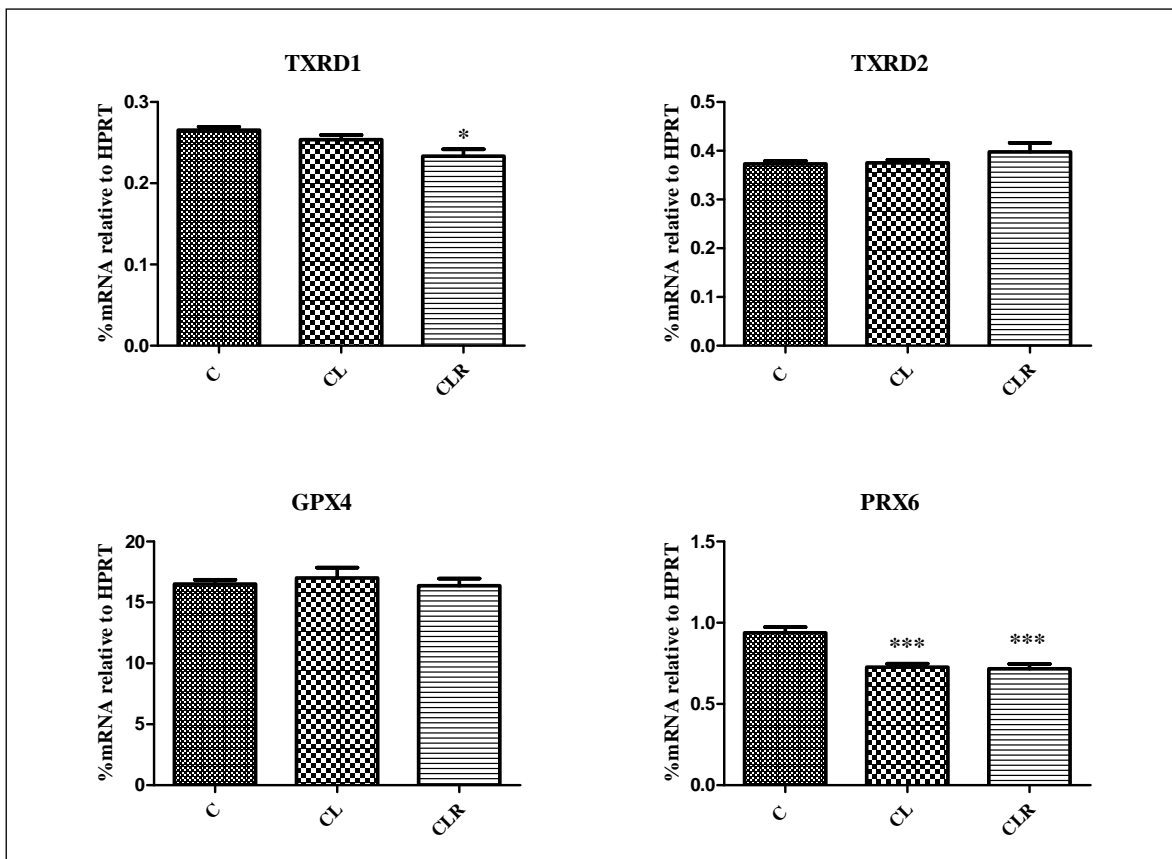
Všechny relativní hladiny mRNA byly vztaženy k referenčnímu genu HPRT.

5.4.1 Antioxidační systém

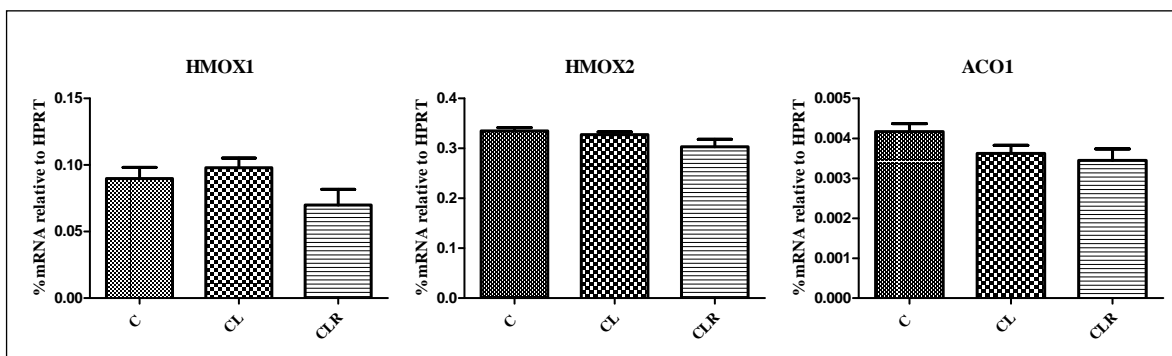
U vybraných genů antioxidačního systému jsme zaznamenali tyto změny. Hladiny mRNA (obr.16) katalázy (CAT), superoxiddismutázy Cu (SOD Cu), superoxiddismutázy Mn (SOD Mn), dále thioredoxinreduktázy 2 (TXRD2) a glutathionperoxidázy 4 (GPX4) (obr.17), dále obou izoform hemoxygenázy (HMOX1, HMOX2) a akonitázy 1 (ACO1) (obr.18) se nezměnily ani u adaptované skupiny, ani u dvoutýdenní regrese oproti kontrolní skupině. Hladina mRNA TXRD1 (obr.17) se nezměnila oproti kontrolní skupině, ale po dvoutýdenní regresi došlo k snížení o 16 % oproti kontrole. Hladina mRNA peroxiredoxínu (PRX6) (obr.17) se snížila o 21 % oproti kontrole a po dvoutýdenní regresi se pokles ještě prohloubil až o 31 % oproti kontrole.



Obrázek 16: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s antioxidační ochranou buněk. Kataláza (CAT), superoxiddismutázy Cu (SOD Cu), superoxiddismutázy Mn (SOD Mn) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů a po následné dvoutýdenní regresi (CLR), n=5.



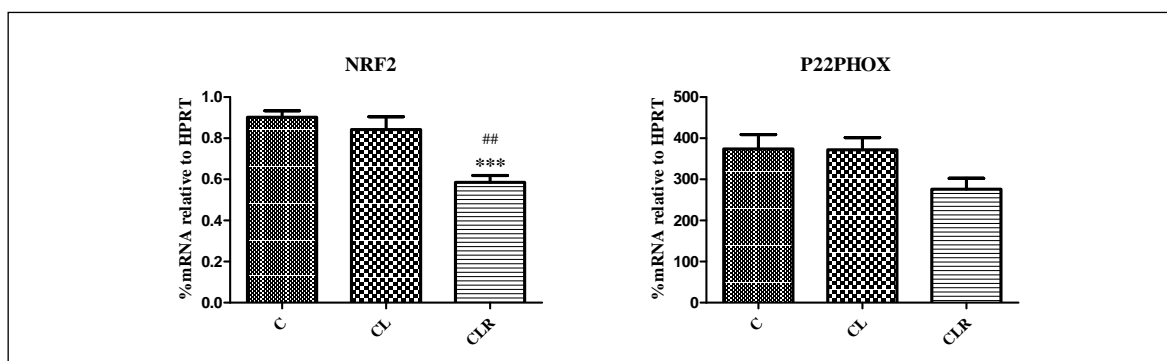
Obrázek 17: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s antioxidační ochranou buněk. Thioredoxinreduktáza 1 (TXRD1), thioredoxinreduktáza 2 (TXRD2), glutathionperoxidáza 4 (GPX4), peroxiredoxin (PRX6) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresi (CLR), dvoutýdenní regresi (CLR), (***) $p < 0,001$ vs C), $n=5$.



Obrázek 18: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s antioxidanty závislými na železe. Hemoxygenáza 1 (HMOX1), hemoxygenáza 2 (HMOX2), akonitáza 1 (ACO1) u kontrolní skupiny (C), chladově adaptované skupiny po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresi (CLR), $n=5$.

5.4.2 Transkripční faktor antioxidantů

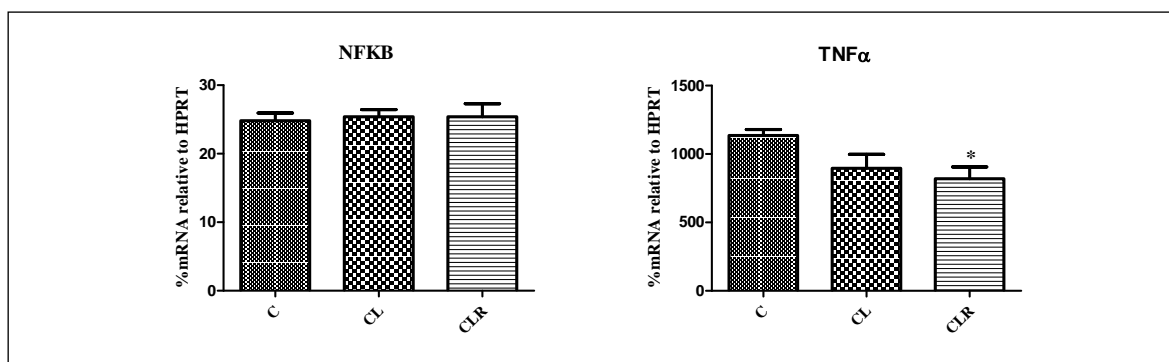
Hladina mRNA u jaderného respiračního faktoru (NRF2) (obr.19) se také nezměnila po chladové adaptaci oproti kontrole, ale u regresní skupiny byla snížena o 35 % oproti kontrole a mezi skupinami byl signifikantní pokles o 28,5 %. Hladina mRNA jeho aktivátoru podjednotky NADPH oxidázy (P22PHOX) (obr.19) se nezměnila ani u jedné skupiny oproti kontrolní skupině, avšak v regresi měla tendenci k poklesu.



Obrázek 19: Relativní hladiny mRNA transkriptů transkripčních faktorů antioxidantů. Jaderný respirační faktor (NRF2), podjednotka NADPH oxidázy (P22PHOX), u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po dvoutýdenní regresí (CLR), (**p<0,01 vs C), (##p<0,01 CL vs CLR), n=5.

5.4.3 Zánět

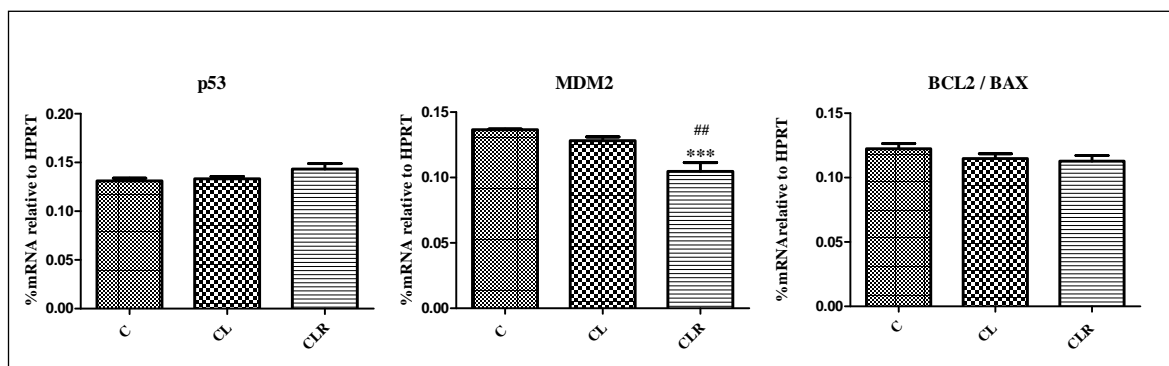
Hladina mRNA se u Nuclear faktor of kappa (NFKB) nezměnila v žádné adaptaci a u tumoru nekrotického faktoru (TNF) (obr.20) nebyla změna mezi 5 týdenním chladem a kontrolou, ale po dvoutýdenní regresi byla hladina snížena o 28 % oproti kontrole.



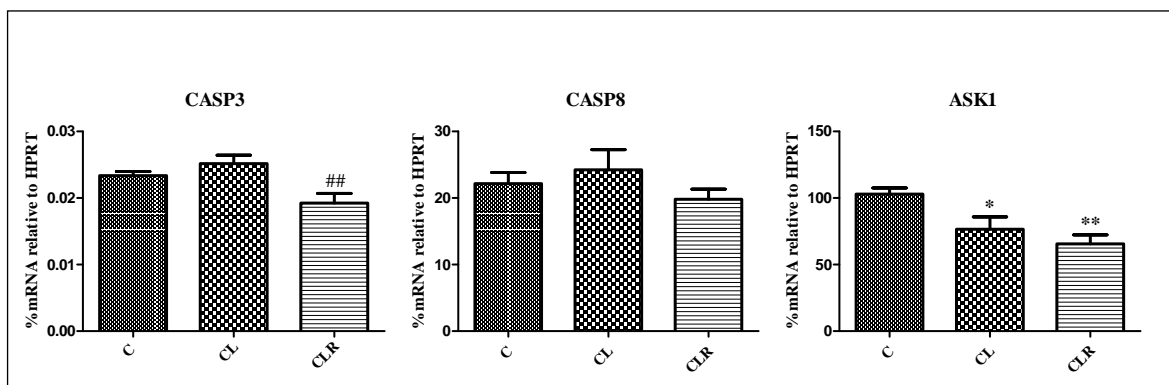
Obrázek 20: Relativní hladiny mRNA transkriptů zánětu. Nuclear faktor of kappa (NFKB), tumor nekrotický faktor α (TNF α), u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po dvoutýdenní regresi (CLR), (* $p < 0,05$ vs C), $n=5$.

5.4.4 Apoptóza

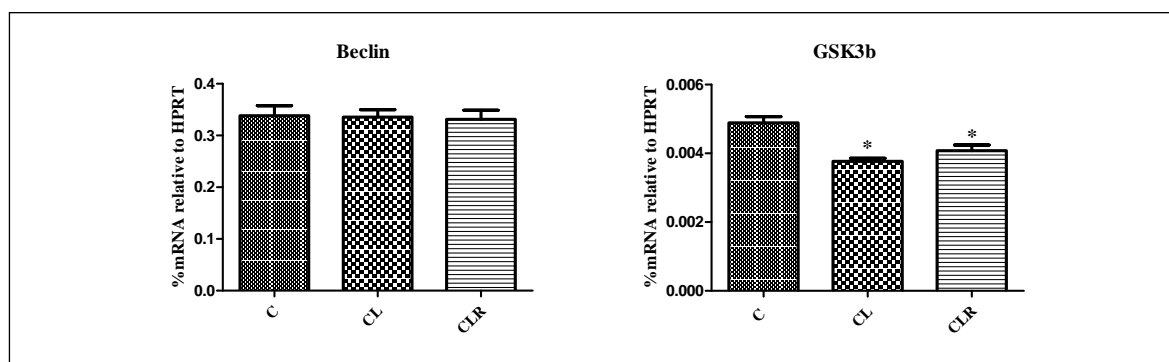
Z vybraných genů apoptózy se nezměnily po pětitédenním chladu hladiny mRNA transkriptů tumor protein p53 (p53) ani jeho cílového genu a regulátoru MDM2, poměr BCL2 /BAX zůstal též nezměněn (obr.21). V následné dvoutýdenní regresi došlo k poklesu MDM2 regulátoru o 28 % oproti kontrole a byl zaznamenán signifikantní pokles mezi skupinami a to o 21 %, což by mohlo svědčit o snížené aktivitě p53 v regresi. Kaspázy 3 a 8 (CASP 3 a 8) zůstaly po adaptaci beze změny, avšak významně poklesla kináza regulující apoptotický signál (ASK1) v obou experimentálních skupinách (obr.22) a to u chronické skupiny o 27 % oproti kontrole a u regresní skupiny došlo ke snížení o 36 % oproti kontrole. Po následné dvoutýdenní regresi došlo k poklesu mezi skupinou adaptovanou na chlad a dvoutýdenní regresí o 33 %. Podobně jako ASK1, významně poklesla v obou adaptacích i GSK3 β zhruba o 35 %. Hladina mRNA pro beclin zůstala nezměněna.



Obrázek 21: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s apoptózou a autofágií. Tumor protein p 53 (p 53), MDM2 - proto onogene (MDM2), BCL2/BAX u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresí (CLR), (***) $p < 0,001$ vs C); (##) $p < 0,01$ CL vs CLR), $n = 5$.



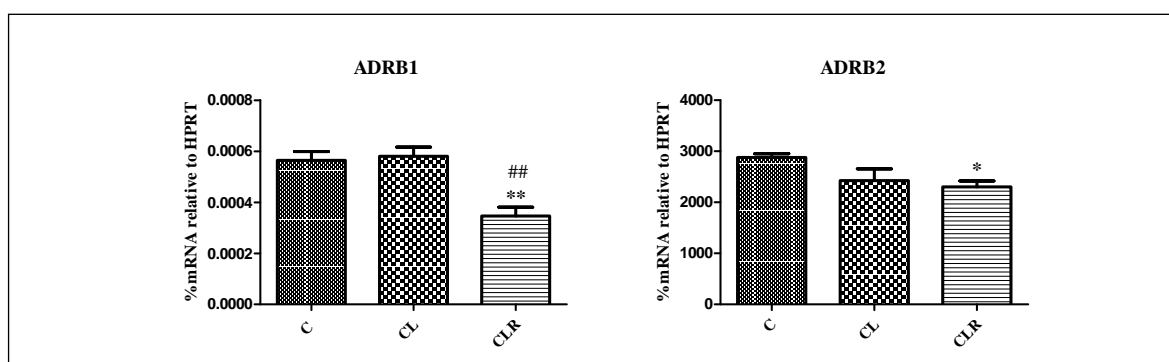
Obrázek 22: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s apoptózou a autofágií. Kaspáza 3 (CASP 3), kaspáza 8 (CASP8), apoptický signál regulující kináza 1 (ASK1) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresí (CLR), (* $p < 0,05$ vs C), (** $p < 0,01$ vs C), (## $p < 0,01$ CL vs CLR), $n=5$.



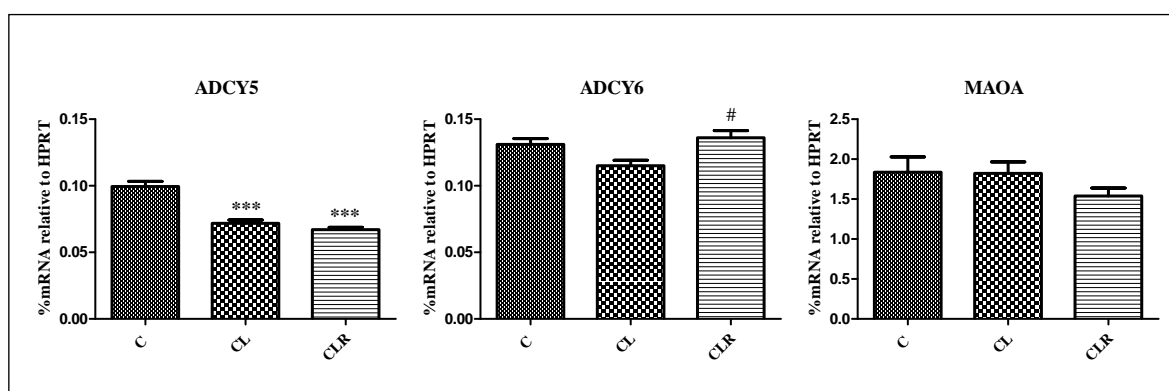
Obrázek 23: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s apoptózou a autofágií. Beclin, glykogensyntázakináza3b (GSK3b) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresí (CLR), (* $p < 0,05$ vs C), $n=5$.

5.4.5 Adrenergní signalizace

U vybraných genů adrenergní signalizace byly naměřeny tyto hodnoty. Hladiny mRNA adrenoreceptoru beta 1 a 2 (ADRB1 a 2) se nezměnily po chladové adaptaci oproti kontrolní skupině a u regresní skupiny významně poklesly o 44 a 20 % oproti kontrole, v uvedeném pořadí (obr.24). Hladina mRNA adenylátcyklázy 5 (ADCY5) byla snížena o 23 %, a u dvoutýdenní regrese se snížila o 32 % oproti kontrole.



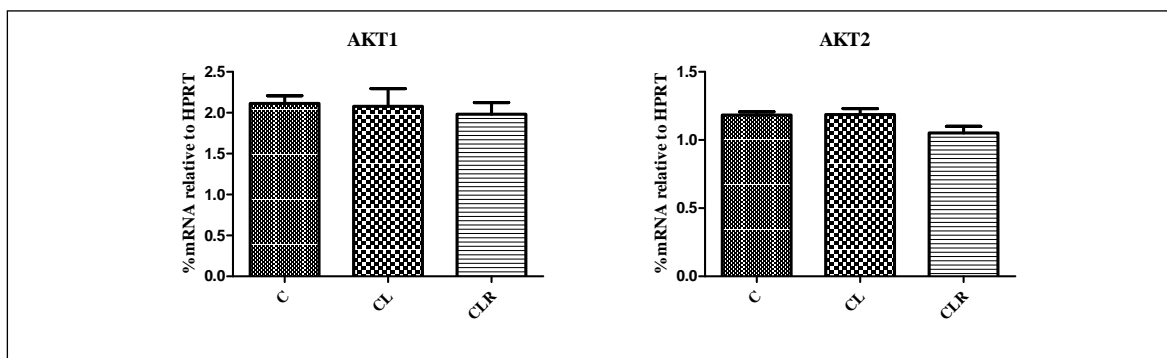
Obrázek 24: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s adrenergní signalizací v srdci. Adrenoreceptor beta 1 (ADRB1), adrenoreceptor beta 2 (ADRB2), u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresi (CLR), (** $p < 0,01$ vs C), (## $p < 0,01$ CL vs CLR), ($p < 0,05$ CL vs CLR), $n = 5$.



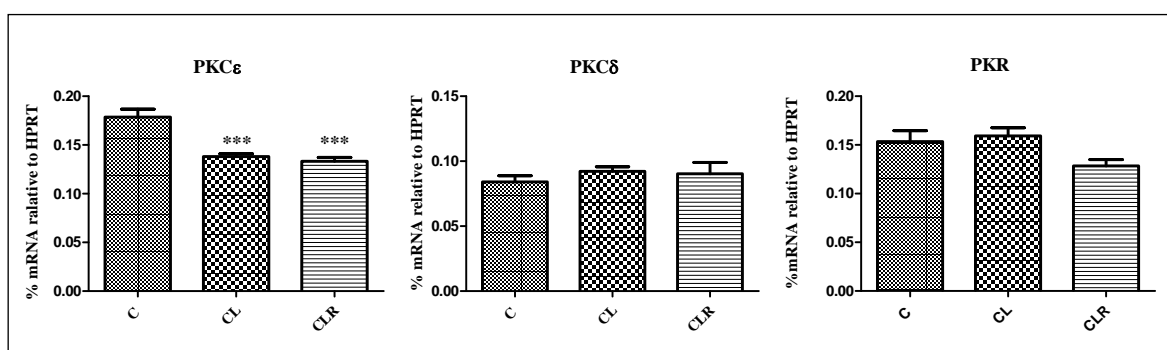
Obrázek 25: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s adrenergní signalizací v srdci. Adenylátcykláza 5 (ADCY5), adenylátcykláza 6 (ADCY6), monoaminoxidáza A (MAOA) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresi (CLR), (*** $p < 0,001$ vs C), (# $p < 0,05$ CL vs CLR), $n = 5$.

5.4.6 Signální molekuly

Z vybraných genů signálních molekul souvisejících s kardioprotekcí se hladiny mRNA nezměnily ani u jedné izoformy u proteinkinázy B1 (AKT1) a proteinkinázy B2 (AKT2) (obr.26). Proteinkináza Cε poklesla u obou experimentálních skupin. U chladově adaptované skupiny o 20 % oproti kontrole a po dvoutýdenní regresí se snížila hladina o 30 % oproti kontrole, zatímco mRNA hladiny PKCδ a PKR se nezměnily (obr.27).



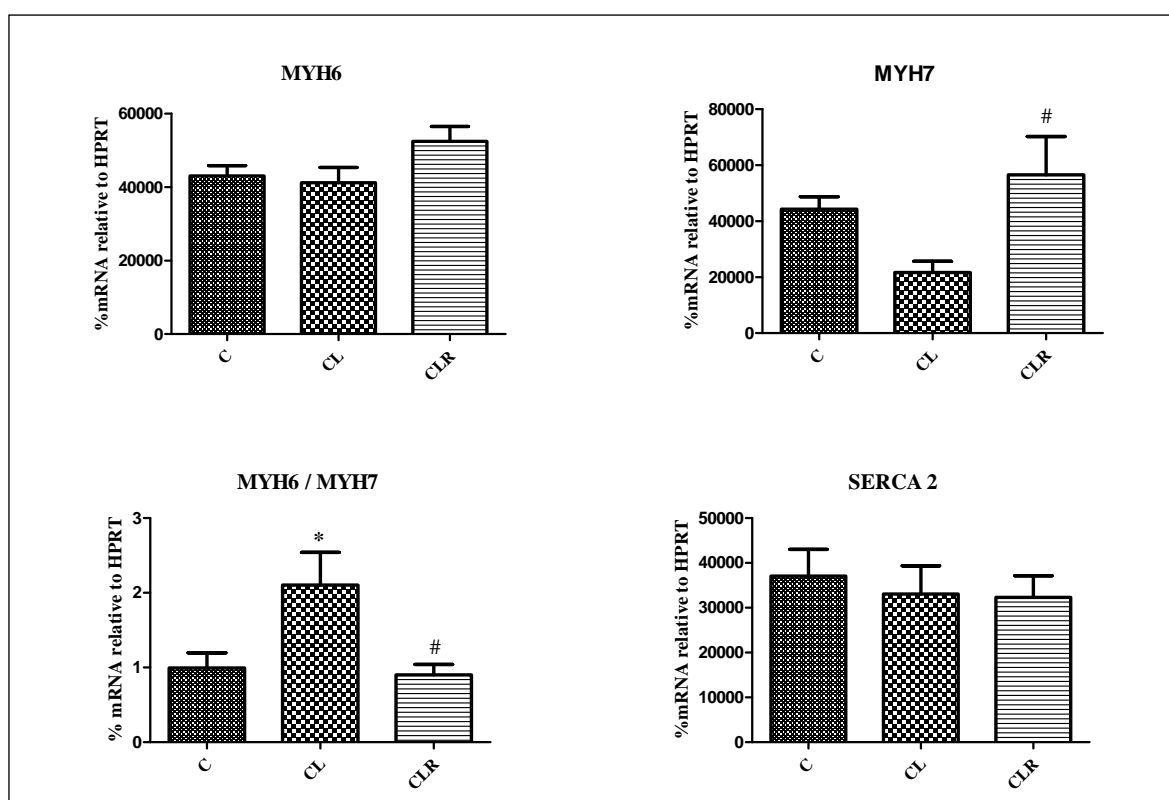
Obrázek 26: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných signálních molekul souvisejících s kardioprotekcí. Proteinkináza B1 (AKT1), proteinkináza B2 (AKT2) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresí (CLR), n=5.



Obrázek 27: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných signálních molekul souvisejících s kardioprotekcí. Proteinkináza C (PKCε), progressive Rod-cone degeneration (PRCδ), proteinkináza R (PKR) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po dvoutýdenní regresí (CLR), (***) $p < 0,001$ vs C, n=5.

5.4.7 Tyroidní hormony a fenotyp srdce

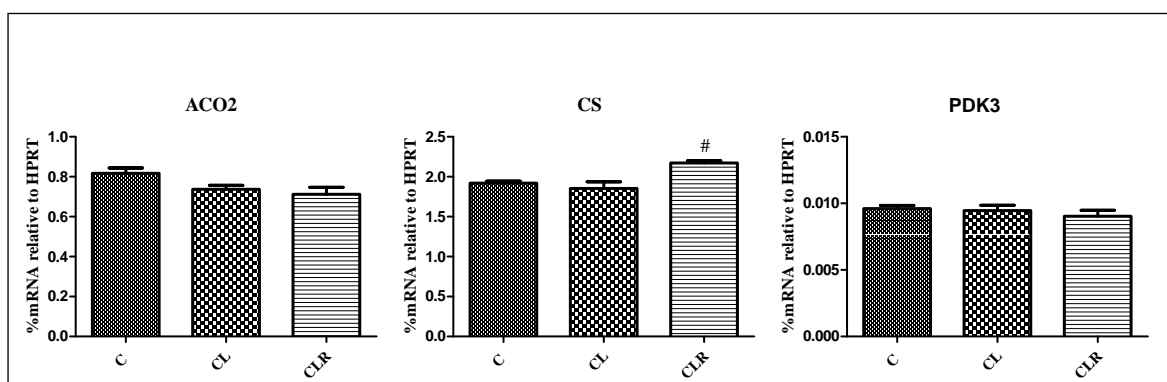
Hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s působením tyroidních hormonů na fenotyp srdce vykazují změny v chladové adaptaci a v regresi se vrací k normálu. Hladina těžkého řetězce myozinu alfa (MYH6) a vápníkové ATPázy sarkoplazmatického retikula (SERCA) se nezměnila ani u jedné skupiny oproti kontrole, ani mezi jednotlivými skupinami. Hladina mRNA u těžkého řetězce myozinu beta (MYH7) nebyla také změněná vzhledem ke kontrole, ale došlo k signifikantnímu nárůstu mezi chladově adaptovanou skupinou a dvoutýdenní regresí o 79 %. Poměr hladina mRNA u MYH6 / MYH7 (obr.28) byla zvýšená u chladově adaptované skupiny o 162 % oproti kontrole a mezi adaptovanou a regresní skupinou došlo k signifikantnímu snížení o 60 % (obr. 28).



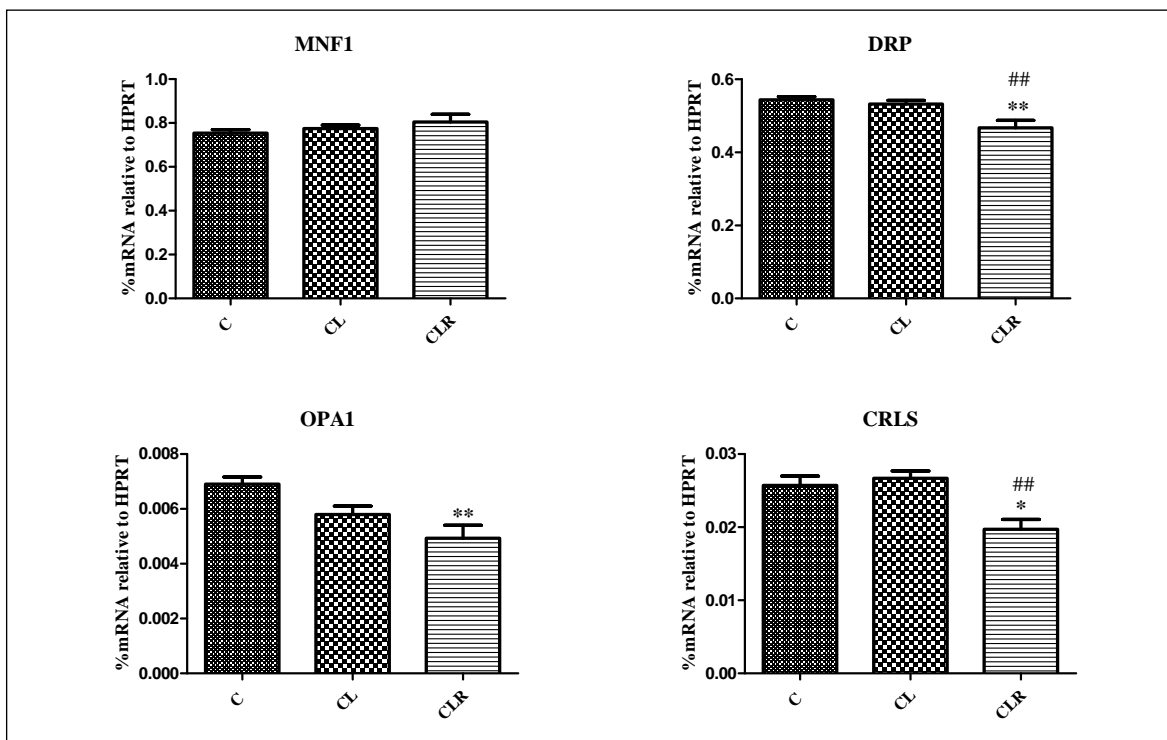
Obrázek 28: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s působením tyroidních hormonů na fenotyp srdce. Těžký řetězec myozinu alfa (MYH6), beta (MYH7) a vápníkové ATPázy sarkoplazmatického retikula (SERCA2), (* $p < 0,05$ vs C), (# $p < 0,05$ CL vs CLR), $n = 5$.

5.4.8 Mitochondrie

Hladiny mRNA enzymů Krebsova cyklu akonikázy 2 (ACO2), pyruvátdehydrogenázakinázy 3 (PDK3) byly nezměněny u všech skupin oproti kontrole. Pouze hladina mRNA cistrátsyntázy (CS) měla signifikantní nárůst o 11 % mezi dvoutýdenní regresí vzhledem ke chladové skupině (obr.29). Dále hladina mRNA související s mitochondriální biogenezí u mitofuzínu 1 (MFN1) byla beze změny u všech skupin oproti kontrole a hladina mRNA mitochondrialního Dynamin-like GTPase (OPA1) se nezměnila po chladové adaptaci oproti kontrole, ale u regresní skupiny došlo ke snížení o 53 % oproti kontrole. Hladina mRNA kardiolipinsyntázy (CRLS) se také nezměnila po adaptaci oproti kontrole, po dvoutýdenní regresi došlo ke snížení hladiny o 27 % a mezi skupinami došlo k poklesu o 31 %. Hladina mRNA Dynamin-Related Protein 1 (DRP) zůstala nezměněná jak u adaptované, tak i u regresní skupiny, ale signifikantní pokles byl mezi skupinami a to o 18 % (obr.30).



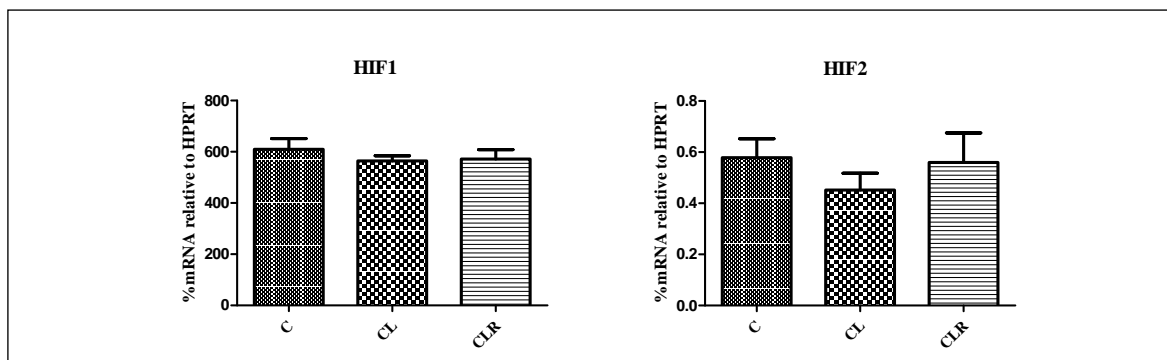
Obrázek 29: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s Krebsovým cyklem. Akonitáza 2 (ACO2), citrátsyntáza (CS), pyruvátdehydrogenázakináza 3 (PDK3) u kontrolních zvířat, chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresí (CLR), (# $p < 0,05$ CL vs CLR), $n = 5$.



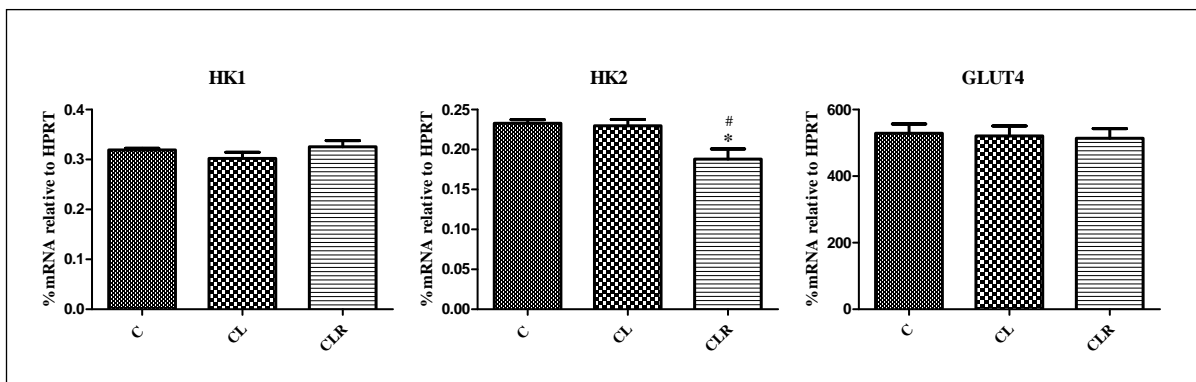
Obrázek 30: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s mitochondriální biogenezí. Mitofuzin (MFN1), dihydropyrimidáza (DRP), protein optické atrofie 1 (OPA1), kardirolipinsyntáza (CRLS) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresí (CLR), (* $p < 0,05$ vs C); (** $p < 0,01$ vs C), (## $p < 0,01$ CL vs CLR), $n = 5$.

5.4.9 HIF a jeho cílové geny

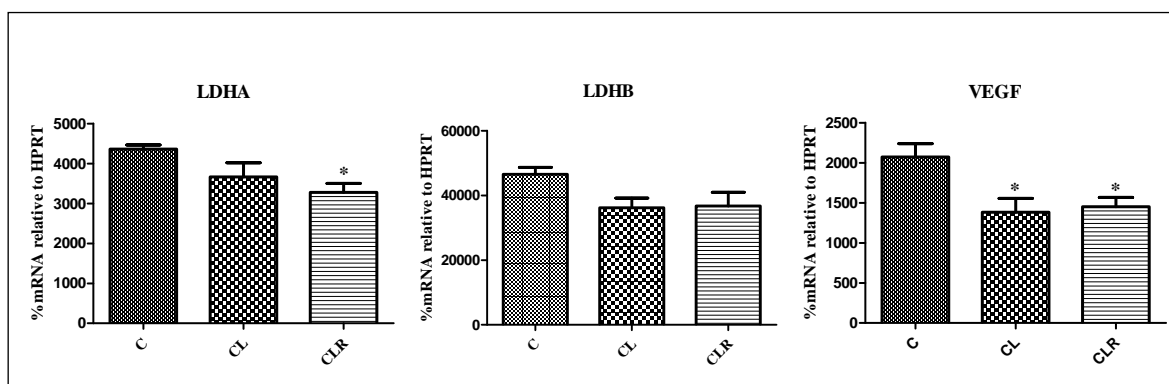
U izoforem hypoxií indukovaného faktoru (HIF 1 a HIF 2) nebyly zjištěny žádné změny v hladině mRNA u jednotlivých skupin oproti kontrole, ani mezi jednotlivými skupinami. Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s transkripční aktivitou HIF spíše nasvědčují jeho snížené aktivitě v regresní skupině. Hladiny mRNA hexokinázy 1 (HK1) a glukozového transportéru 4 (GLUT 4) se nezměnily ani u jedné skupiny po adaptaci oproti kontrole. Hladina mRNA hexokinázy 2 (HK2) se nezměnila oproti kontrole, ale snížila se hladina po dvoutýdenní regresi o 21 % a došlo ke snížení mezi adaptovanou skupinou a regresní o 22 % (obr.32). Dále hladina mRNA laktátdehydrogenázy A (LDHA) se nezměnila oproti kontrole, ale po dvoutýdenní regresi došlo ke snížení o 25 % oproti kontrole. Za to hladina mRNA laktátdehydrogenázy B (LDHB) se nezměnila ani u jedné skupiny oproti kontrolní skupině. Dále hladina mRNA růstového faktoru endoteliálních cév (VEGF) se snížila o 33 % oproti kontrole a u regresní skupiny bylo snížení o 30 % oproti kontrole (obr.33).



Obrázek 31: Relativní hladiny mRNA transkriptů Hypoxií indukovaného faktoru (HIF1, HIF2) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresi (CLR), n=5.



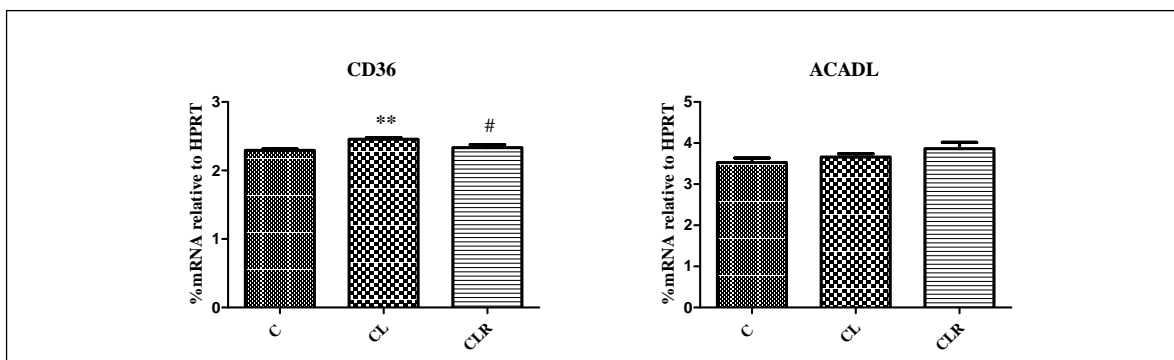
Obrázek 32: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s transkripční aktivitou Hypoxií indukovaného faktoru (HIF). Jedná se o enzymy glykolýzy Hexokináza (HK1, HK2), glukózový transportér (GLUT 4) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresi (CLR), (* $p < 0,05$ vs C), (# $p < 0,05$ CL vs CLR), $n = 5$.



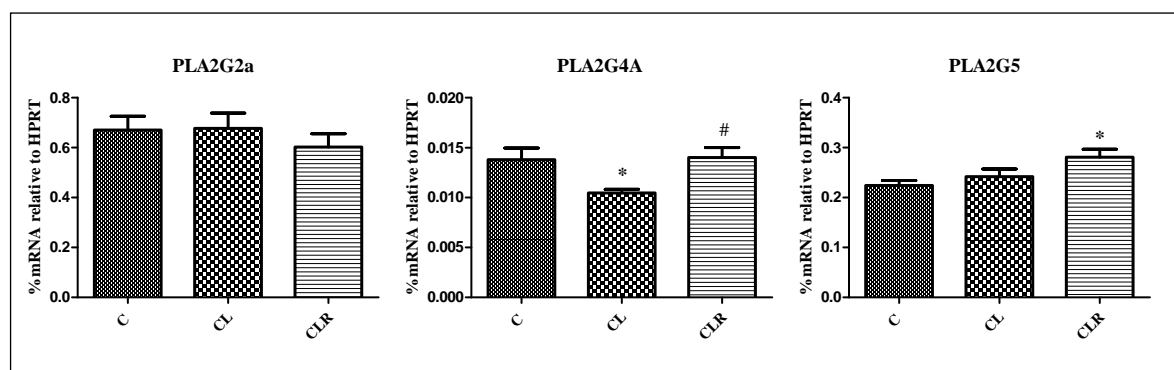
Obrázek 33: Relativní hladiny mRNA transkriptů vybraných genů souvisejících s transkripční aktivitou Hypoxií indukovaného faktoru (HIF). Jedná se o izoformy laktátdehydrogenázy (LDHA, LDHB) a růstového faktoru endoteliálních cév (VEGF) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresi (CLR), (* $p < 0,05$ vs C), $n = 5$.

5.4.10 Lipidový metabolismus

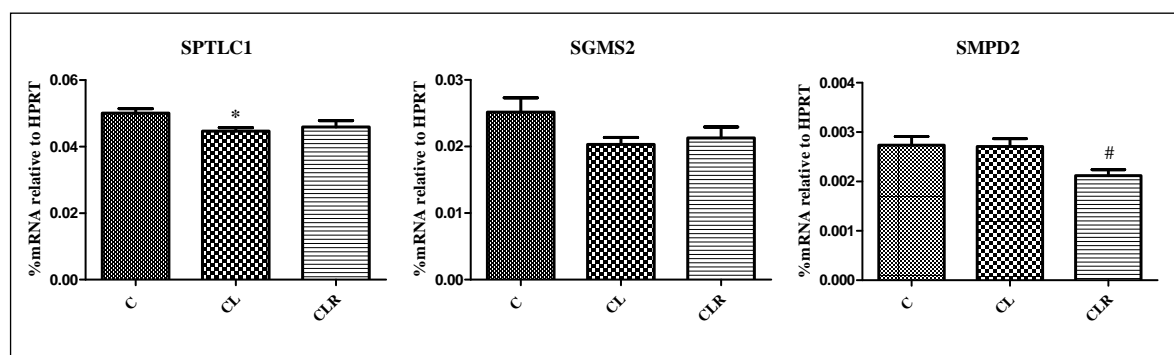
Z vybraných genů lipidového metabolismu se hladina mRNA transportéru mastných kyselin (CD36) zvýšila o 3 % po adaptaci vzhledem ke kontrole a po dvou týdnech regrese hladina mRNA byla nezměněná oproti kontrole, ale signifikantní snížení bylo zaznamenáno mezi experimentálními skupinami o 11 %. Hladina mRNA u acyl-KoenzymA-dehydrogenázy (ACADL) se nezměnila ani u jedné skupiny oproti kontrole, ani mezi sebou (obr.34). Stejného výsledku bylo dosaženo v hladině mRNA u fosfolipázy 2A ze skupiny II A (PLA2G2A). Hladina mRNA fosfolipázy 2A ze skupiny IVA (PLA2G4A) se snížila o 33 % oproti kontrole a po dvoutýdenní regresi nedošlo ke změně v hladině mRNA. Hladina mRNA u fosfolipázy 2A ze skupiny 5 (PLA2G5) se nezměnila oproti kontrole, ale po dvoutýdenní regresi došlo ke zvýšení o 15 % oproti kontrole (obr.35). Hladina mRNA serinepalmitoyltransferázy (SPTLC1) se snížila oproti kontrole o 8% a v regresi byla beze změny. Hladina mRNA u sfingomyelinsyntetázy 2 (SGMS2) se nezměnila ani u jedné skupiny. Dále hladina mRNA sfingomyelinfosfodiesterázy 2 (SMPD2) se nezměnila oproti kontrole u žádné skupiny, ale signifikantní rozdíl byl mezi skupinami a to o 21,3 % (obr.36). Hladina mRNA u alkalická ceramidáza 2 (ACER2) se nezměnila po adaptaci ani u jedné skupiny oproti kontrole. Hladina mRNA kyselé fosfatázy typu 2A ze skupiny II A (PPAP2A) se snížila o 7 % oproti kontrole a po dvoutýdenní regresi došlo k zvýšení o 8 % (obr.37). Hladina mRNA u peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPRAG) snížila o 27 % po chladové adaptaci oproti kontrole a u regrese došlo ke snížení o 33 % oproti kontrole. Hladina mRNA peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARA) se snížila o 19 % oproti kontrole, u regresní skupiny se hladina snížila o 34 % a mezi regresní a chladově adaptovanou skupinou došlo k snížení o 15 %. Dále hladina mRNA peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1α (PGC1α) se nezměnila oproti kontrole po chladové adaptaci, ale u regresní skupiny se snížila o 26 % (obr.38).



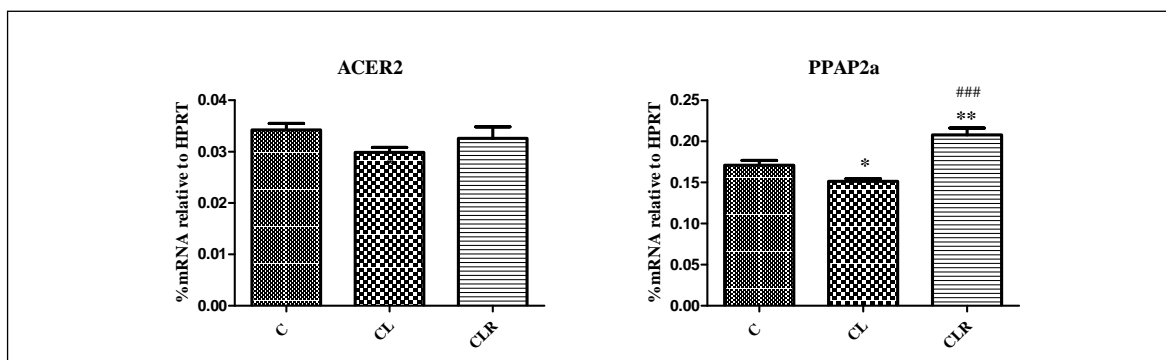
Obrázek 34: Relativní hladiny mRNA transkriptů lipidového metabolismu, transportér mastných kyselin (CD 36), Acyl-KoenzymA-dehydrogenáza (ACADL) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresi (CLR), (**p<0,01 vs C), (#p<0,05 CL vs CLR), n=5.



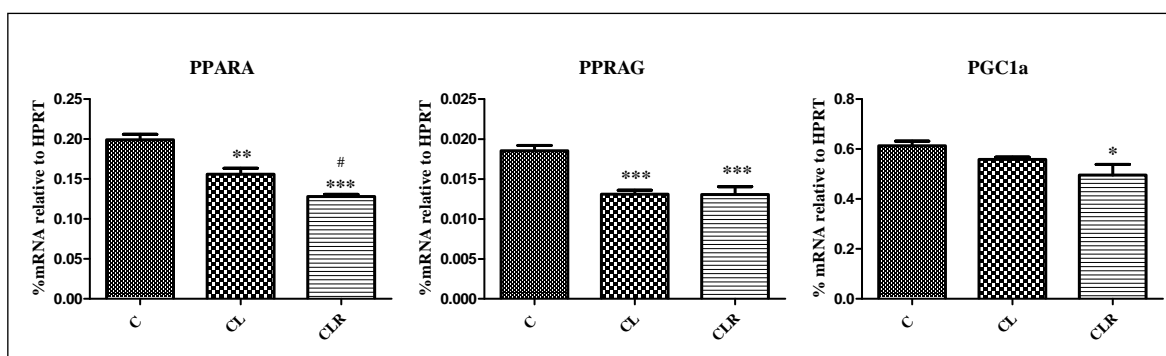
Obrázek 35: Relativní hladiny mRNA transkriptů lipidového metabolismu, izoforem fosfatáz (PLA2G2a, PLA2G4a, PLA2G5) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresi (CLR), (*p<0,05 vs C); (#p<0,05 CL vs CLR), n=5.



Obrázek 36: Relativní hladiny mRNA traskriptů lipidového metabolismu, serinepalmitoyltransferáza (SPTLC1), sfingomyelinsyntetázy 2 (SGMS2), sfingomyelinfosfodieteráza 2 (SMPD2) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresi (CLR), (*p<0,05 vs C), (#p<0,05 CL vs CLR), n=5.



Obrázek 37: Relativní hladiny mRNA transkriptů lipidového metabolismu, alkalická ceramidáza 2 (ACER2), kyselá fosfatáza typu 2A PPAP2a), u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresi (CLR), (* $p < 0,05$ vs C), (** $p < 0,01$ vs C), (### $p < 0,001$ CL vs CLR), $n=5$.



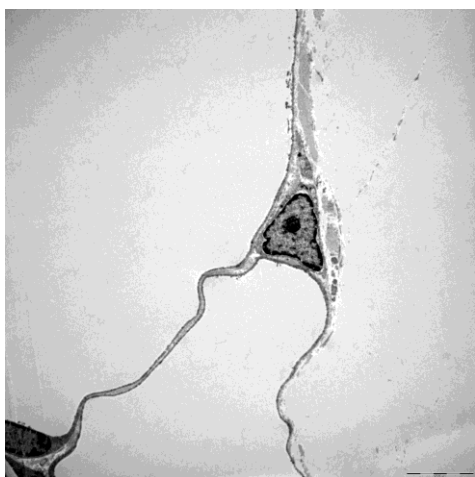
Obrázek 38: Relativní hladiny mRNA transkriptů lipidového metabolismu, peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARA), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPRAG), peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 α (PGC1a) u kontrolních zvířat (C), chladově adaptované po dobu 5 týdnů (CL) a po následné dvoutýdenní regresi (CLR), (* $p < 0,05$ vs C), (** $p < 0,01$ vs C); (*** $p < 0,001$ vs C), (# $p < 0,001$ CL vs CLR), $n=5$.

6 Diskuse

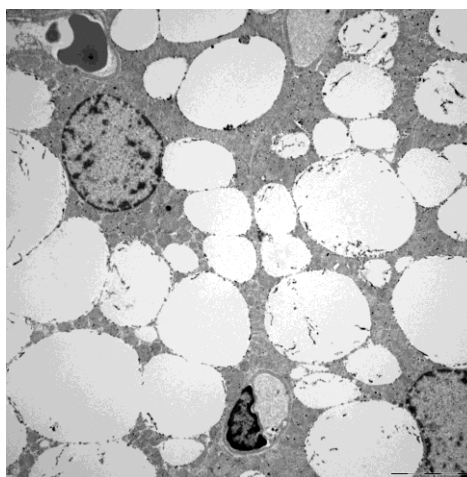
První tři týdny považujeme za chladový stres a adaptaci v pravém slova smyslu chápeme alespoň do dokončeného čtvrtého týdne. V našich experimentech jsme proto použili 5 týdnů chladové expozice.

Tato diplomová práce měla za úkol postihnout metabolické změny u potkanů adaptovaných na chlad po dobu 5 týdnů v 10 °C a u potkanů, kteří byli vystaveni 2 týdenní regresi. V rámci metabolických změn byl sledován pitný režim, proveden krevní obraz, analýza séra a byly sledovány hmotnostní parametry. Úspěšnost adaptace byla potvrzena kontrolou rozvoje hnědé tukové tkáně, která standardně dosahovala hmotnosti zhruba 1g. Tkáň byla poskytnuta Dr. Drahotovi k analýzám mitochondriální respirace. Hnědá tuková tkáň se liší na první pohled a na obr.39 je zobrazena její ultrastruktura, která vypovídá o vysokém obsahu mitochondrií, proti bílému tuku.

A)



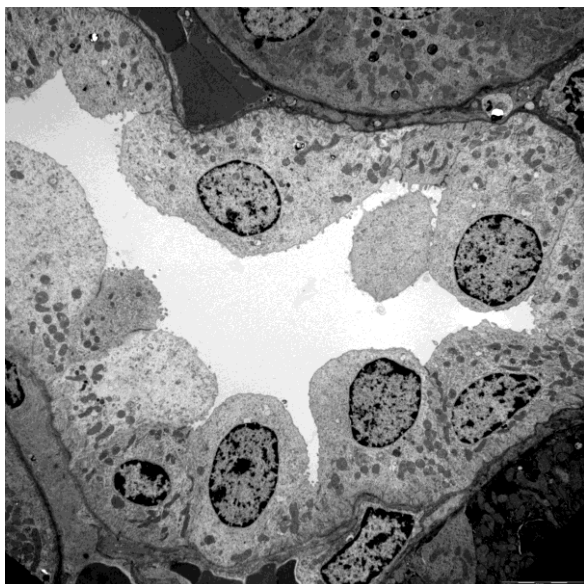
B)



Obrázek 39: Porovnání ultrastruktury bílé (A) a hnědé (B) tukové tkáně pomocí transmisního elektronového mikroskopu Jeol JEM 2011. Měřítko odpovídá 5000nm. (Autor obrázku: Dr. Barbara Elsnicová, PhD)

Chladově adaptovaní potkani s normálním přístupem k vodě v průměru pijí stejně jako kontrolní skupina, ale vylučují zhruba dvojnásobek moči oproti kontrolní skupině. Je zajímavé, že bilance tekutin je u kontroly s omezeným přístupem k vodě zhruba stejná jako u chladových potkanů i v regresi. To by mohlo znamenat, že tento poměr příjmu a výdeje

tekutin je jakési bazální minimum, které zvířatům stačí a nezpůsobí zvláštní aktivitu zvířat, aby zvýšila příjem tekutin. Pokles příjmu vody u chladových zvířat se ztíženým přístupem k vodě dokazuje, že chladově adaptovaní potkani potřebují méně pít než ostatní skupiny. Moč je pro chladově adaptované potkany přebytná tekutina, kterou by museli ohřívat a spotřebovali by k jejímu ohřátí velké množství energie, proto je pro ně výhodné přebytnou tekutinu vyloučit (ústní sdělení od pana doc. Vybírala). U otužilců bylo též zaznamenáno zvýšení objemu moči po otužování ze 135 ml na 174 ml (Siems, 1999) zhruba o jednu třetinu. V rámci pitného režimu byl také v současné práci sledován fenomén „thermogenic drinking“ (Fregly, 1982). V naší adaptaci (10 °C) nebyla prokázána dehydratace potkanů, jak popisuje prof. Fregly. Zdá se, že poškození ledvin a nadledvinek popisované při adaptaci 0 - 4 °C (Xing a kol., 2014), může být způsobeno zvolenou teplotou adaptace. V této práci, diagnostika moči neprokázala žádné patologické hodnoty a ani na kontrolních snímcích získané pomocí elektronové mikroskopie, které zobrazují neporušenou ultrastrukturu ledvin (obr.40), nebyla nalezena defragmentující jádra typická pro apoptózu ani dezorganizace jiných struktur.



Obrázek 40: Ultrastruktura ledviny zobrazená pomocí transmisního elektronového mikroskopu Jeol JEM 1011. Na ultrastruktuře buněk nejsou patrné žádné známky apoptózy. Měřítka odpovídá 5000nm. (Autor obrázku: Dr. Barbara Elsnicová, PhD)

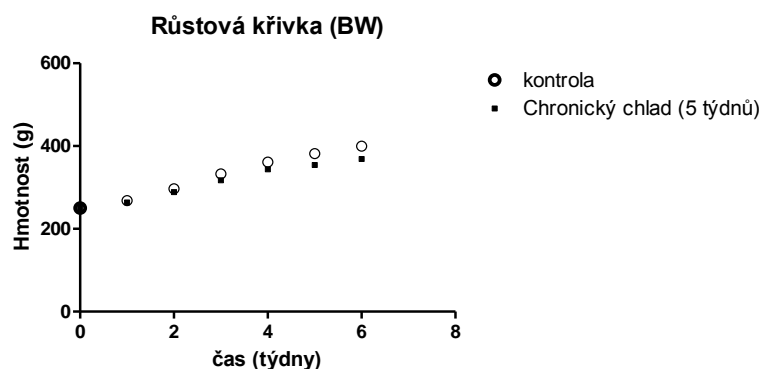
U pěti kontrolních potkanů byly zjištěny zvýšené hodnoty dusitanů a jeden potkan měl zvýšené hodnoty bílkovin a větší množství krve. Zvýšená hodnota bílkovin naznačuje infekci močových cest. Za to zvýšené hodnoty dusitanů ukazují na výskyt bakterií v moči,

což může být způsobeno kontaminací moči. Výskyt krve v moči v našem případě byl způsoben poraněním drápu potkana v metabolické komoře a následným odtokem do sběrné nádoby na moč.

Z literatury vyplývá, že se během roční sezonality mění parametry v krvi u lidí, proto jsme se zaměřili na analýzu krevního obrazu a biochemickou analýzu séra u potkanů, otázkou tedy je, zda tyto změny souvisejí se samotným chladem. V krevním obraze potkanů nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou adaptovanou na chlad po dobu 5 týdnů. Biochemická analýza séra zaznamenala pouze jeden signifikantní nárůst, a to při hodnocení glukózy mezi kontrolní skupinou a chronicky adaptovanou skupinou. V ostatních parametrech nedošlo k žádnému signifikantnímu rozdílu. Při odběru krve jsme zaznamenali rychlejší srážlivost krve, která korelovala s délkou adaptace (3,5 a 7 dní) v pilotních experimentech na podzim. Otázkou je, zda dochází k zahušťování krve během chladové adaptace sníženým obsahem plazmy, anebo k zvýšené produkci pro-srážlivých faktorů. Bylo zjištěno, že viskozita plazmy má své maximum v lednu a minimum v červnu. Sedimentace červených krvinek a plasmonigen mají své maximum v srpnu. LDL-cholesterol má maximum v lednu a minimum v červnu. HDL-cholesterol má své maximum v srpnu a minimum v únoru. Triglyceridy mají své maximum v listopadu a minimum v dubnu (Fröhlich, 1997). Další krevní parametry byly během sezóny sledovány též u lidí. Během zimních měsíců se zvyšuje glukóza z 5,2 na 5,5 mmol/l, celkový cholesterol z 5,34 na 5,52 mmol/l, LDL-cholesterol z 3,33 na 3,55 mmol/l, HDL-cholesterol z 1,25 na 1,33 mmol/l, triglyceridy z 1,45 na 1,67 mmol/l a lipoprotein A z 214,7 na 245,1 mg/l. Dále dochází ke zvyšování PAI-1 antigenu z 17,3 na 19,5 mmol/l, PAI aktivita z 11,4 na 13,2 IU/ml a fibrinogenu z 2,80 na 3,41 g/l (Marvi, 2001). I v dalších studiích byla zaznamenána zvýšená koncentrace glukózy v krvi v chladnějším prostředí podobně jako v této práci. Oxidace glukózy v plazmě je silně stimulovaná nízkou intenzitou třesu (+138%), ale jako palivo hraje minoritní roli 10 % v produkci tepla (Dumke a kol. 2015, Haman a kol. 2002).

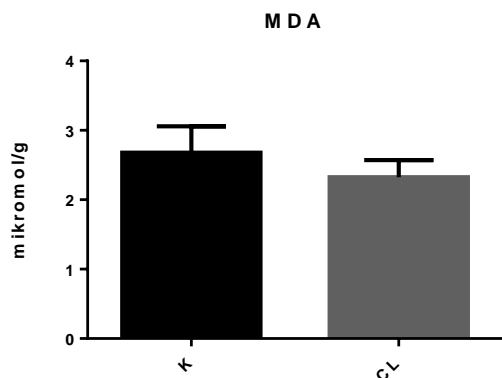
Ve studiích týkajících se otužování a chronických adaptací na nízké teploty se setkáváme také se záznamem tělesných hmotností. Pokusy na tanách severních (*Tupaia belangeri*), které byly umístěná do 5 °C na 4 týdny, ukázaly, že tany přibíraly na hmotnosti více než kontrolní skupina. Ale po návratu do 25 °C se jejich hmotnost snížila oproti kontrolní skupině (Zhang a kol. 2012). Což je obrácený trend než u potkanů v prezentované práci,

naopak křeček reagoval podobně. Celá sledovaná skupina křečků (*Phondopus sungorus*) byla umístěná do 22 ± 2 °C a poté část byla přemístěná do 10 ± 2 °C. Jejich hmotnost se snížila z $33,5 \pm 2,7$ g na $32,6 \pm 2,3$ g (Korhonen a kol. 2008). I na rybičkách byly dělané pokusy sledující chladovou a teplovou adaptaci a u chladově adaptovaných došlo k zvýšení hmotnosti o 14 % oproti kontrole a k snížení tělesné hmotnosti o 11 % u teplově adaptovaných oproti kontrolní skupině (Vergauwen, 2010). Byla sledována hmotnost mužů v $7,2$ °C (chladné prostředí), ve 22 °C (neutrální prostředí) a ve 43 °C (teplé prostředí). Nejvíce na hmotnosti muži ztratili z počáteční hmotnosti $75,2 \pm 2,6$ kg ve 43 °C (583 ± 143 g) ve srovnání s ostatními prostředími (v chladném prostředí 130 ± 106 g a v neutrálním prostředí 102 ± 119 g) (Dumke a kol. 2015). Existují i práce, které poukazují, že i během teplové adaptace nemusí docházet ke změnám v tělesné hmotnosti (Chen a kol. 2014). Naše hodnoty také ukazují snížení hmotnosti během pěti týdenní adaptace na chlad oproti kontrolní skupině a následný návrat na úroveň kontrol během dvoutýdenní regrese v zimním období. Avšak v letním období nedošlo k signifikantním změnám v tělesných hmotnostech potkana během stejné adaptace (obr.41), což může nasvědčovat o sezóních rozdílech v odpovědi metabolismu na chladovou expozici. Jak ukazuje graf, tak zvířata přibírala přibližně stejně. Dále v zimním období byl zjištěný nárůst hmotnostního srdečního indexu o 25 %, který vymizel v regresi. Xing a kol. (2014) dokládá, že hypertrofie vyvolaná chladem je reverzibilní a tedy fyziologická. Při srovnání tělesné hmotnosti s hmotností potkaních srdcí v naší práci je zřejmé, že nárůst srdečního indexu je podpořen poklesem hmotnosti potkanů, jelikož hmotnosti srdcí zůstaly napříč skupinami skoro stejné.



Obrázek 41: Růstová křivka během letní adaptace u kontrol chovaných ve 25 °C (prázdná kolečka, $n=30$) a chladově adaptovaných potkanů (plné kostičky, $n=30$)

Chronická chladová adaptace s teplotou 10 °C je naprosto ojedinělý model a neexistují k němu relevantní údaje. V průběhu dvouleté studie jsem zpracovala více výsledků, avšak nejsou zcela kompletní, a proto nejsou uvedené v této práci. Začínala jsem měřením exprese v akutních fázích chladové adaptace 3, 5 a 7 dní, které ukázaly například zvýšenou aktivitu antioxidačního systému, která se v chronické a regresní fázi již nepotvrdila a naznačuje tendenci k poklesu, což podporuje rozdělení dlouhodobé adaptace na dvě fáze, fázi stresovou a adaptační (Xing, 2014). Jediný enzym, který má tendenci k nárůstu v antioxidačním systému je kataláza (CAT). Kataláza chrání organismus před působením peroxidu vodíku a u potkana je přítomná jak v cytosolu, tak v mitochondriích (Chelikani a kol. 2003). Z analýz venózní krve otužilců vyplývá, že bazální koncentrace GSH, aktivita SOD a CAT je zvýšená společně se sníženou koncentrací oxidovaného glutathionu a kyselinou močovou. To svědčí o zvýšeném podílu GSH/GSSG a tedy o zvýšené antioxidační kapacitě. Naše předběžné výsledky ukázaly tendenci k poklesu u malondialdehydu u letní adaptace (obr.42) což je v souladu s nízkým oxidačním stresem doloženým v uvedené literatuře. Koncentrace kyseliny močové byla snížena z 2,148 mmol/l na 1,736 mmol/l. Po 15 minutách otužování, byla zaznamenána zvýšená koncentrace HNE (Siems, 1999), což dokumentuje zvýšený oxidační stres v akutním chladu. U dlouhodobé chladové adaptace 35–105 dní u potkanů byly analyzovány antioxidanty a indikátory oxidativního stresu v jednotlivých tkáních a překvapivě se výsledky lišily. V tenkém střevě a v hnědém tuku byla zvýšená aktivita GPX. Pouze v hnědém tuku byla zvýšená aktivita CAT, kyseliny askorbové a GSH. Glutathion reduktáza byla zvýšená v mozku, v játrech a v hnědém tuku. Aktivita GST byla naopak snížena v játrech a v hnědém tuku. V krvi byla snížena GSH a kyselina askorbová v krvi byla zvýšená (Spasić a kol. 1993). Antioxidačními enzymy, GSH a lipidovou peroxidací v hnědém tuku se také zabíral Gustavo Barja de Quiroga (1991). V kosterním svalu byla sledována zvýšená aktivita CAT o 71 % a v ledvinách o 20 %. V srdečním svalu byla také zvýšená aktivita CAT a GPx o 40 – 43 % (Selman, 2000).



Obrázek 42: Koncentrace malondialdehydu (MDA) v kontrolní (K) a chladové adaptaci (CL) letní (n=5).

V případě nedostatečnosti antioxidačního systému se zvyšuje oxidační stres, který při nadměrném rozsahu je destruktivní a aktivuje apoptózu. Apoptóza může být spuštěna dvěma základními cestami, vnitřní a vnější. Vnitřní, mitochondriální, cestou je míněno poškození DNA většinou nadměrnou produkcí ROS a vnější cesta je zprostředkována přes receptor smrti. Při poškození DNA se zvyšuje hladina p53, který je regulovaný např. MDM2 a dalšími geny RNF2, DBC1 (Lee a kol. 2015). Střední hypotermie měla pozitivní vliv a snížila apoptózu neuronů a proapoptotické proteiny (BAX, BAD, CASP3, CASP9), současně zvýšila BCL2 (Zhang a kol. 2015). Na našem modelu se zdá, že apoptóza je spíše také snížena obzvláště po dvoutýdenní regresí, kdy se snižuje CASP3, ASK1 a cílové gen p53, MDM2. Také došlo ke snížení zánětlivé odpovědi, kterou zprostředkovává $TNF\alpha$.

Zdrojem oxidačního stresu může být i zvýšená adrenergní signalizace, která je zvýšená v akutní fázi a v dlouhodobé adaptaci dochází k její down-regulaci (Jánský a kol. 2008, Xing, 2014). Z našich výsledků vyplývá pokles ADRB1 a ADRB2 adrenergních receptorů v regresní fázi, zatímco po pětítýdenním chladu se nemění. Během adaptace se nemění ADCY6, ale ADCY5 se snižuje v obou experimentálních skupinách, což by mohlo znamenat sníženou odpověď signálních drah na ní závislých. Jedná se o velký počet signálních drah. Mimo jiné se jedná o spojení AKT signální dráhy s glukózovým metabolismem (Rathmell a kol. 2003), Zvýšená ADCY5 je mimo jiné spojována se zvýšeným rizikem diabetu typu 2 (Hodson a kol. 2014) a její snížení prokazatelně snížilo oxidační stres, což může mít protektivní charakter. MAOA, která se účastní degradace noradrenalinu na synaptických spojích a současně byla prokázána na vnější membráně mitochondrií, může být též zdrojem volných radikálů v srdci (Mialet-Perez a kol. 2007,

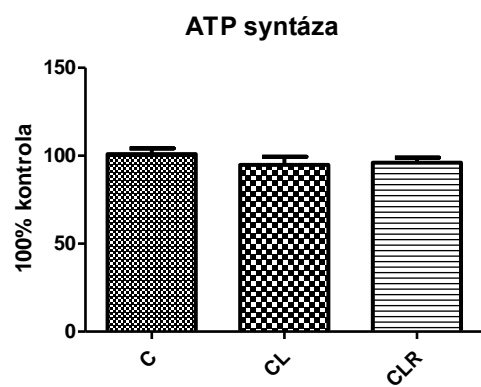
Kaludercic a kol. 2014). Zdá se, že chladová adaptace její působení nemění, neboť mRNA zůstala beze změn. Zvýšená aktivita adrenergního systému na počátku adaptace může ovlivňovat fenotyp srdce skrze aktivaci deiodáz a zvýšení T3 působení přes tyroidní receptory v srdci (Kim a kol. 2004). Poměry mezi jednotlivými izoformami tyroidních receptorů určují správný vývoj srdce (White a Dauncey, 1999). Naše výsledky ukazují, že po pětítýdenním chladu se mění fenotyp levého srdce ve prospěch MYH6, která má vyšší ATPázovou aktivitu. Což by odpovídalo zvýšenému vlivu tyroidních hormonů, který je v souladu s nepatrným zvýšením tyroidních hormonů v krvi a patrně dochází k aktivaci příslušných deiodáz. Během regresní fáze je tendence k nárůstu obou izoform MYHC, avšak jejich poměr se neliší od kontroly. Hladina mRNA SERCA se také nezměnila ani u jedné skupiny oproti kontrole.

Jak tyroidní hormony, tak i adrenergní signalizace zasahuje do lipidového metabolismu (Pucci a kol. 2000). Lipidový metabolismus je velice důležitý nejen při otužování, ale dokáže prodloužit šanci na přežití v nepříznivých podmínkách. Tuky v těle mají tři základní funkce. Fungují jako tepelná izolace, jako energetický zdroj a jejich metabolity jsou významnými signálními molekulami (Wymann a kol. 2008). Na druhé straně, pokud je oslaben thyroideální systém, tak dochází k nerovnováze v metabolismu lipidů, který vede k závažným onemocněním na mnoha úrovních včetně srdce (Schulze, 2009). Pokud je člověk vystaven chladnému vzduchu, tak jako palivo využívá sacharidy, ale pokud se ponoří do studené vody, nebo se ochlazuje lokálně, tak využívá lipidy. Je to strategický krok, jelikož dojde k nahrazení omezeného zdroje energie, sacharidů a může souviset s ozdravnými úspěchy Kneippovy otužovací metody. Tuky dovolují udržovat tepelnou produkci déle a zvyšují tak šanci na přežití (Haman, 2002). Naše změny na úrovni mRNA v levé srdeční komoře jsou velmi malé a je nutné tyto informace ověřit na proteinové úrovni. Zdá se, že na našem modelu je ustavena rovnováha mírně ve prospěch lipidového metabolismu, kdy mírně, ale signifikantně roste CD36 po adaptaci na chlad a klesá HK2 v regresi. V lipidovém metabolismu jsme dále pozorovali vzestup fosfolipázy PLA2G5. V srdci je významně zastoupena a podílí se na jeho remodelaci (Ishikawa a kol. 2005). Její aktivita může být spojena se zánětlivými procesy. V naší práci TNF α významně klesá v regresi, zatímco v této skupině PLA2G5 dosahuje signifikantního nárůstu. Zdá se tedy, že se nejedná o význaný rozvoj zánětu, ale o možnou modulaci těchto procesů. Tato fosfolipáza je též spojována s kardioprotektivními mechanismy (Kerkelä a kol. 2011, Yano a kol. 2011). Dalším enzymem z této skupiny, jehož mRNA vzrostla v regresi, ale

významně klesla v chronickém chladu, je kyselá fosfatáza PAP2A, která má jako hlavní funkci degradaci lipidových mediátorů fosfolipáz, sfingomyelináz a lipidových kináz, mezi které patří kyselina fosfatidová a lysofosfatidová, ceramid1-P a sfingosin1-P. To by mohlo svědčit o zvýšeném působení těchto molekul v chladu a jejich výraznou degradaci po návratu do tepla. Z tohoto se zdá, že signální mechanismy aktivované v chladu nepřetrvávají, ale liší se od chladové adaptace. V souladu s tím může být útlum sfingomyelin fosfodiesterázy SGSM2 v regresi.

Role HIF1 v hnědém tuku během chladové adaptace je spekulativní (Vucetic a kol., 2011). HIF aktivuje převážně geny glykolytického metabolismu jehož produkty mají významnou signální funkci (Semenza, 2013), a proto jeho zvýšenou aktivitu v chladové adaptaci v srdci, které je zaměřené spíše na lipidový metabolismus neočekáváme. Během pětítýdenního chladu dochází k tendenčnímu poklesu hladiny mRNA a po dvoutýdenní regresi má hladina tendenci se navrátit na přibližně stejnou hladinu jako kontrola. Naše výsledky ukazují, že během pěti týdenního chladu dochází k utlumení jeho cílového genu VEGF a tím k utlumení angiogeneze a růstu endoteliálních buněk, Dále u hexokinázy 2, která se podílí na glykolytickém metabolismu, antiapoptické a buněčné signalizaci (Roberts a kol. 2013) došlo k poklesu hladiny mRNA v regresi, avšak během chronické adaptace se hladina neměnila stejně jako u hexokinázy 1 a glukozového transportéru 4. Z toho lze usuzovat, že náš model adaptace nezasahuje podstatným způsobem do glykolýzy, což je v souladu s tím, že není změněna ani PDK3, která je zodpovědná za spojení anaerobní glykolýzy a Krebsova cyklu. Expresí izoform laktátdehydrogenázy A i B, která se během obou adaptací snižuje, by mohla přispět k nižší tvorbě laktátu a je to v souladu se snižující se hladinou laktátu u otužilců (Roberts a kol. 2013). Zde by bylo možné očekávat posílení mitochondriálního metabolismu, avšak z naměřených hodnot se nezdá, že tomu tak je. Pouze mírný nárůst CS tímto směrem poukazuje. Proto jsme stanovili množství ATP syntázy na proteinové úrovni, abychom zjistili, zda se mění množství mitochondrií. Výsledek (obr.43) ukazuje, že ATP syntáza se nemění, což nasvědčuje, že se nemění ani mitochondriální masa. Snížení syntázy kardiolipinu a následně kardiolipinu samotného může mít dopad na funkci OXPHOS komplexu a integrace proteinů do mitochondriální membrány (Claypool a Koehler 2013) a ovlivnit tak syntézu ATP. Zatím není jasné, co znamená zjevný útlum mitochondriální biogeneze, který je signalizován snížením PPAR γ , PGC1 α , OPA1 a DRP1. Toto snížení mitochondriální dynamiky může mít za následek snížení producentů ROS, které by mohlo souviset

s protekcí sledované v regresní fázi. Sledování těchto změn na proteinové úrovni je nezbytné.



Obrázek 43: Hladina ATP syntázy

7 Závěr

Tato práce přinesla primární výsledky na novém modelu chladové adaptace ve zvýšené teplotě (10 ± 2 °C) s posupným nástupem chladu. Ukázali jsme, že tento model vede k dostatečnému rozvoji hnědého tuku, což svědčí o úspěšném průběhu adaptace a současně nepůsobí poškození ledvin jako teploty blízké nule, kde autoři neuvádějí postupné snižování teploty. Co se týká nárůstu srdečního hmotnostního indexu, tak se v našem případě jedná spíše o pokles tělesné hmotnosti a nikoliv o nárůst srdeční masy, a tedy o srdeční hypertrofii. Tomu nasvědčují i nezměněné hodnoty mRNA exprese u AKT, VEGF a HIF cílových genů, které v hypertrofii bývají aktivované. Krevní parametry nebyly změněny, avšak hospodaření s vodou se u adaptovaných zvířat velmi liší. Dochází k nižšímu příjmu vody a k vyšší produkci moči, což může hypoteticky vést k určitému stupni dehydratace. Avšak zvířata nepociťovala větší potřebu pít v průběhu prvních hodin a prvního dne po návratu do tepla. Lze tedy usuzovat, že jde o adaptační stav, který nepůsobí zvířatům pocit nedostatku vody. Vedle toho nebyly nalezeny žádné patologické změny v moči a snímky TEM ledvin neprokázali přítomnost nekrotických ložisek.

Výsledky screeningu mRNA exprese přinesly velmi zajímavé výsledky, které jednoznačně nasvědčují tomu, že mechanismy aktivované u chladové adaptace jsou rozdílné proti výsledkům nalezeným v kardioprotektivních režimech hypoxie. Akutní fáze vystavení chladu, na kterých se podílí větší stresová reakce než na dlouhodobé adaptaci, mají trendy v expresi mRNA spíše podobné chronické adaptaci na hypoxii například ve zvýšeném antioxidačním systému, který u chronického chladu většinou klesá. Podobně je tomu u mRNA apoptotických markerů, které v hypoxii mají tendenci růst a u chladové adaptace výrazně klesají. Klíčem k těmto rozdílům může být posun metabolismu srdce odlišným směrem než u hypoxie a chladu a udržování energetické homeostázy rozdílnými mechanismy. V hypoxii je významně aktivován adrenergní systém i po chronické expozici a dráha HIF, která posiluje metabolismus glukózy, naopak chladová adaptace stimuluje dráhy lipidového metabolismu, který je pro srdce přirozeně dominantní a dochází k desenzitizaci adrenergního systému. Možná to je příčina velmi malého nárůstu transportéru mastných kyselin CD36, a také proč nenacházíme výrazné změny v expresi genů souvisejících s lipidovým metabolismem. Naproti tomu, nacházíme pokles klíčového enzymu glykolýzy, který reguluje vstup glukózy do buněk, hexokinázy 2 v regresní fázi

(CLR). Stejně tak v regresní fázi klesá exprese obou adrenoreceptorů a ADCY5 klesá v obou experimentálních skupinách. Též maker zánětu $\text{TNF}\alpha$ klesá výrazně v regresní fázi spolu s významným transkripčním faktorem pro antioxidační systém, NRF2.

Překvapením bylo snížení exprese PPARA, PPRAG a PGC1a, jak po adaptaci, tak v regresi, které zatím nedokážeme vysvětlit. Odpověď na tuto otázku vyžaduje další studium a primárně stanovení hladin proteinů, neboť není vždy pravidlem, že mRNA hladina se mění konsistentně s hladinou proteinu. Pokud by byl zaznamenán i pokles na proteinu, nasvědčovalo by to celkovému snížení energetického metabolismu a mnoha dalších signálních drah. Fenotyp srdce se mění po pětítýdenním chladu ve prospěch těžkého řetězce myozínu alfa (MYH6), což odpovídá zvyšující tendenci tyroidních hormonů v krvi.

Závěrem lze říci, že nový model adaptace můžeme přijmout jako model zcela fyziologický, neboť nepoškozuje ledviny a neprokázali jsme žádné jiné patologické změny ve vyšetřovaných parametrech. Hmotnostní parametry ukazují snižování tělesné hmotnosti v chladové adaptaci během zimního období, ale postačují pouze dva týdny po chladové adaptaci k normalizaci tělesné hmotnosti i hmotnostního srdečního indexu, avšak letní adaptace neproказuje stejný průběh. Výsledky exprese mRNA naznačují, že po dvou týdnech adaptace dochází k útlumu adrenergní signalizace a snížení apoptózy a zánětu, což by mohlo mít kardioprotektivní účinek. Zajímavý je výsledek, který by mohl naznačovat útlum biogeneze mitochondrií, avšak neměnnou expresi a kapacitu Krebsova cyklu a dále pokles antioxidačního systému. Zdá se tedy, že chronická adaptace snižuje oxidační stres a tudíž bude využívat mechanismy protekce na oxidačním stresu nezávislé. Tato pilotní studie vyžaduje doplnění informací na úrovni proteinu a funkční měření mitochondriálního metabolismu, aby zmíněné náznaky byly potvrzeny.

8 Internetové zdroje

<http://www.genecards.org/>

<http://www.urologieprostudenty.cz/chemicke-vysetreni-moce>

<http://www.stefajir.cz/?q=bilkovina-v-moci>

9 Použitá literatura

- Ahsan MK., Lekli I., Ray D., Yodoi J. and Das DK. (2009) Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: an implication of redox gene therapy in the heart. *Antioxid Redox Signal.* 11(11): 2741-58
- Akhmedov AT., Rybin V. and Marín-García J. (2015) Mitochondrial oxidative metabolism and uncoupling proteins in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 20(2): 227-49. Review
- Arnoštová P, Jedelsky PL, Soukup T and Žurmanová J. (2011) Electrophoretic mobility of cardiac myosin heavy chain isoforms revisited: application of MALDI TOF/TOF analysis. *J Biomed Biotechnol.* 2011: 634253.
- Azzu V., Jastroch M., Divakaruni AS. and Brand MD. (2010) The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1797: 785–91
- Barja de Quiroga G., López-Torres M., Pérez-Campo R., Paz Nava A. and Puerta M. (1991) Effect of cold acclimation on GSH, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brown adipose tissue. *Biochem. J.* 289-292
- Bodyak N., Rigor DL., Chen YS., Han Y., Bisping E., Pu WT. And Kang PM. (2007) Uncoupling protein 2 modulates cell viability in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293: 829-35
- Bull GM. & Morton J. (1978) Environment, temperature and death rates. *Age Ageing.* 7(4): 210–24
- Claypool S. and Koehler C. (2012) The Complexity of Cardiolipin in Health and Disease. *Trends Biochem Sci.* 37(1): 32–41
- De Lorenzo F., Mukherjee M., Kadziola Z., Sherwood R. and Kakkar VV. (1998) Central cooling effects in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond).* 95(2): 213–7
- Dillmann W. (2010) Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling. *Heart Fail Rev.* 15(2): 125-32

Drew K. L., Buck C. L., Barnes B. M., Christian S. L., Rasley B. T. and Harris M. B. (2007) Central nervous system regulation of mammalian hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance. *J. Neurochem.* 102: 1713-1726

Dumke Ch., Slivka D., Cuddy J., Hailes W., Rose S. and Ruby B. (2015) The effect of environmental temperature on glucose and insulin after an oral glucose tolerance test in healthy young men. *Wilderness & Environmental medicine*

Echtay KS. (2007) Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med.* 43: 1351-71

Fedmann HM., Golozoubova V., Cannon B. and Nedergaard J. (2009) UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.* 9: 203-9

Fedorov V. V., Li L., Glukhov A., Shishkina I., Aliev R. R., Mikheeva T., Nikolski V.P., Rosenshtaukh L. V. and Efimov I. R. (2005) Hibernator *Citellus undulatus* maintains safe cardiac conduction and is protected against tachyarrhythmias during extreme hypothermia: possible role of Cx43 and Cx45 up-regulation. *Heart. Rhythm.* 2: 966 – 975

Feldberg W. and Myers R. D. (1963) A New Concept of Temperature Regulation by Amines in the Hypothalamus. *Nature.* 200: 1325

Feldberg W. and Myers R. D. (1964) Effects on temperature of amines injected into the cerebral ventricles. A new concept of temperature regulation. *The Journal of Physiology.* 173: 226-237

Fiedler J., Jara P., Luza S., Dorfman M., Grouselle D., Rage F., Lara HE. and Arancibia A. (2006) Cold stress induces metabolic activation on thyrotrophin – releasing hormone – synthesising neurones in the magnocellular division of the hypothalamic paraventricular nucleus and concomitantly changes ovarian sympathetic activity parameters. *J Neuroendocrinol.* 18: 367 -76

Flachs P., Rossmeisl M., Kuda O. and Kopecky J. (2013) Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent of UCP1: a key to lean phenotype. *Biochim Biophys Acta*. 1831(5): 986-1003

Franklyn JA. (2013) The thyroid--too much and too little across the ages. The consequences of subclinical thyroid dysfunction. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 78(1):1-8. Review

Fregly (1982) Thermogenic drinking: mediation of osmoreceptors and angiotensin II pathway. *Fed Proc*. 41: 2515-2519

Fregly MJ., Rossi F., Cade JR. (1994) A role for thyroid hormones in cold-induced elevation of blood pressure and cardiac hypertrophy. *Physiol Pharmacol*. 72: 1066-74

Fröhlich M., Sund M., Russ M., Hoffmeister A., Fischer G. H., Hombach V. and Koenig W. (1997) Seasonal variations of rheological and hemostatic parameters and acute – phase reactants in young, healthy subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 17: 2692-2697

Gao Z., Wilson E.T., Drew C.R., Ettinger J. and Monahan D. K. (2012) Altered coronary vascular control during cold stress in healthy older adults. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 302: 312–318

Gerdes AM. & Iervasi G. (2010) Thyroid replacement therapy and heart failure. *Circulation*. 122(4): 385-93

Greenberg R. L., Ahnert M. A., Patel C. N., Bennett E. C., Elliott N., Lundquist M., Miller A., Feiner C. E., Kurt A., Glenn-Porter B., Scott M. and Burmeister B. D. (2014) Sex differences in cardiac arrest survivors who receive therapeutic hypothermia. *American Journal of Emergency Medicine*. 32: 545–548

Haman F., Péronnet F., Kenny G., Massicotte D., Lavoie C., Scott Ch. and Weber J. (2002) Effect of cold exposure on fuel utilization in humans: plasma glucose, muscle glycogen, and lipids. *J Appl Physiol*. 93: 77–84

Hanzlíková H. (2015) Vliv proměnlivosti počasí a teplotních extrémů na onemocnění oběhové soustavy (Disertační práce)

- Herpin P., Berthon D., Bertin R., De Marco F., Dauncey MJ. and Le Dividich J. (1995) Cold-induced changes in circulating levels of catecholamines and thyroid hormones are modulated by energy intake in newborn pigs. *Exp Physiol.* 80(5): 877-80
- Hodson D., Mitchell R., Marselli L., Pullen T., Brias S., Semplici F, Everett K., Cooper D., Bugliani M., Marchetti P., Lavallard V., Bosco D., Piemonti L., Johnson P., Hughes S., Li D., Li W., Shapiro A. and Rutter G. (2014) ADCY5 couples glucose to insulin secretion in human islets. *Diabetes.* 63: 3009-3021
- Huang YH., Tsai MM. and Lin KH. (2008) Thyroid hormone dependent regulation of target genes and their physiological significance. *Chang Gung Med. J.* 31: 325-34
- Chelikani, P. Carpena X., Fita I. and Loewen PC. (2003) An electrical potential in the access channel of catalases enhances catalysis. *The Journal of Biological Chemistry.* 278(33): 31290-31296
- Chen K., Wang Ch., Wang G and Zhao Z. (2014) Energy budget, oxidative stress and antioxidant in striped hamster acclimated to moderate cold and warm temperature. *Journal of Thermal Biology.* 44: 35–40
- Ishikawa Y., Komiyama K., Masuda S., Murakami M., Akasaka Y., Ito K., Akishima-Fukasawa Y., Kimura M., Fujimoto A., Kudo I. and Ishii T. (2005) Expression of type V secretory phospholipase A in myocardial remodelling after infarction. *Histopathology.* 47(3): 257-67
- Jánský J., Matoušková E., Vávra V., Vybíral S., Jánský P., Jandová D., Knížková I. and Kunc P. (2006) Thermal, Cardiac and Adrenergic Responses to Repeated Local Cooling. *Physiol. Res.* 55: 543-549
- Jánský L., Janáková H., Uličný B., Šrámek P., Hošek V., Heller J, Pařízková J. (1996) Changes in thermal homeostasis in humans due to repeated cold water immersions. *Pflugers Arch.* 432 (3): 368-72.
- Janský L., Pospisilova D., Honzova S., Ulicny B., Sramek P., Zeman V. and Kaminkova J. (1996) Immune system of cold-exposed and cold-adapted humans. *Eur. J.Appl. Physiol.* 72: 445–450

- Jánský L., Vybíral S., Trubačová M. and Okrouhlík J. (2008) Modulation of adrenergic receptors and adrenergic functions in cold adapted humans. *Eur J Appl Physiol.* 104: 131-135
- Ježek P. (2002) Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins - UCPn. *Int J Biochem Cell Biol.* 34(10): 1190-206. Review
- Johansson B. W. (1996) The hibernator heart--nature's model of resistance to ventricular fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 31: 826-832
- Kaludercic N., Mialet-Perez J., Paolocci N., Parini A. and Di Lisa F. (2014) Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 73: 34-42
- Kerkelä R., Boucher M., Zaka R., Gao E., Harris D., Piuhola J., Song J., Serpi R., Woulfe KC., Cheung JY., O'Leary E., Bonventre JV. and Force T. (2011) Cytosolic phospholipase A(2) α protects against ischemia/reperfusion injury in the heart. *Clin Transl Sci.* 4(4): 236-42
- Kim B., Carvalho-Bianco SD. and Larsen PR. (2004) Thyroid hormone and adrenergic signaling in the heart. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 48 (1): 171-5
- Korhonen T., Mustonen A., Nieminen P. and Saarela S. (2008) Effects of cold exposure, exogenous melatonin and short-day treatment on weight-regulation on body temperature of the Siberian hamster. *Regulatory Peptides.* 149: 60–66
- Kraushik S. and Kaur J. (2003) Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. *Clinica Chimica Acta.* 333: 69–77
- Lanni A, De Felice M, Lombardi A et al. (1997) Induction of UCP2 mRNA by thyroid hormones in rat heart. *FEBS Lett.* 418(1-2): 171-4
- Laurberg P, Andersen S, Karmisholt J. (2005) Cold adaptation and thyroid hormone metabolism. *Horm Metab Res.* 37(9): 545-9. Review

- Lee H., Ahn S. and Jang H. (2015) Cold – inducible RNA binding protein, CIRP, inhibits DNA damage - induced apoptosis by regulating p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications* XXX: 1- 6
- Leppäluoto J., Pääkkönen T., Korhonen I. and Hassi J. (2005) Pituitary and autonomic responses to cold exposures in man. *Acta Physiol Scand.* 184(4): 255–64
- Levine M., Duffy L., Moore D. and Matej L. (1995) Acclimation of a non – indigenous sub – Arctic population: seasonal variation in thyroid function in interior Alaska. *Comp. Biochem. Physiol.* 111A: 209-214
- Mailloux RJ., Adjeitey CN., Xuan JY. and Harper ME. (2012) Crucial yet divergent roles of mitochondrial redox state in skeletal muscle vs. brown adipose tissue energetics. *FASEB J.* 26: 363-75
- Marvi A., Guzik-Salobir B., Salobir-Pajnic B., Keber I., Stare J. and Stegnar M. (2001) Seasonal variations of some metabolic and haemostatic risk factors in subjects with and without coronary artery disease. *Blood coagulation and fibrinolysis.* 12: 359-365
- Maslov LN. And Vychuzhanina EA. (2015) Role of sympatho – adrenomedullar system in adaptation to cold. *Russ Fyziol Zh Im I M Sechenova.* 101: 145-62
- Mattiasson G. And Sullivan P. (2006) The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxidants & Redox Signaling.* 8: 1 – 38. Review
- McLeod CJ., Aziz A., Hoyt RF., McCoy JP. and Sack MN. (2005) Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia. *J Biol Chem.* 280: 33470-6
- Menkes M., Matthews A., Krantz D., Lundberg U., Mead L., Qaqish B., Liang K., Thomas C. and Pearson T. (1989) Cardiovascular reactivity to the cold pressor test as a predictor of hypertension. *Hypertension.* 14 (5): 524-30
- Modriansky M., Murdza-Inglis DL., Patel HV., Freeman KB. and Garlid KD. (1997) Identification by site-directed mutagenesis of three arginines in uncoupling protein that are essential for nucleotide binding and inhibition. *J Biol Chem.* 272: 24759-62

Neild PJ., Syndercombe - Court D., Keatinge WR., Donaldson GC., Mattock M. and Caunce M. (1994) Cold-induced increases in erythrocyte count, plasma cholesterol and plasma fibrinogen of elderly people without a comparable rise in protein C or factor X. *Clin Sci (Lond)*. 86(1): 43-8

Nicholls DG. (2001) A history of UCP1. *Biochem Soc Trans*. (Pt 6): 751-5

O'Reilly I., Murphy MP. (1992) Studies on the rapid stimulation of mitochondrial respiration by thyroid hormones. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 127(6): 542-6

Ozcan C., Palmeri M., Horvath TL., Russell KS. And Russell RR. (2013) Role of uncoupling protein 3 in ischemia-reperfusion injury, arrhythmias, and preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 304: 1192-200

Pantos C., Mourouzis I. and Cokkinos DV. (2012) Thyroid hormone and cardiac repair/regeneration: from Prometheus myth to reality? *Can J Physiol Pharmacol*. 90 (8): 977 - 87

Perez M., Bianchi P., Kunduzova O. and Parini A. (2007) New insights on receptor-dependent and monoamine oxidase-dependent effects of serotonin in the heart. *J Neural Transm*. 114(6): 823-7

Perrino C., Schiattarella GG., Sannino A., Pironti G., Petretta MP., Cannavo A., Gargiulo G., Iardi F., Magliulo F., Franzone A., Carotenuto G., Serino F., Altobelli GG., Cimini V., Cuocolo A., Lombardi A., Goglia F., Indolfi C., Trimarco B. and Esposito G. (2013) Genetic deletion of uncoupling protein 3 exaggerates apoptotic cell death in the ischemic heart leading to heart failure. *J Am Heart Assoc*. 2: e000086

Pfaffl M 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29: e45

Piktelakol J. S., Rosenbaum D. S. and Wilson L. D. (2012) Mild Hypothermia Decreases Arrhythmia Susceptibility in a Canine Model of Global Myocardial Ischemia. *Crit. Care. Med*. 40(11): 2954–2959

Poher AL., Altirriba J., Veyrat-Durebex C. and Rohner-Jeanrenaud F. (2015) Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity/insulin resistance. *Front Physiol.* 6: 4

Pol Ch., Muller A. and Simonides W. (2010) Cardiomyocyte – specific inactivation of thyroid hormone in pathologic ventricular hypertrophy: an adaptative response or part of the problem? *Heart Fail Rev.* 15: 13 –142

Polderman KH. (2009) Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med.* 7: 186-202

Pucci E., Chiovato L. and Pinchera A. (2000) Thyroid and lipid metabolism. *International Journal of Obesity.* 24: 109-112

Rathmell J., Casey J. Fox, David R. Plas, Peter S. Hammerman, Ryan M. Cinalli, and Craig B. Thompson (2003) Akt-directed glucose metabolism can prevent bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol.* 23(20): 7315–7328

Reynolds AM., Lee RE Jr . and Costanzo JP. (2014) Membrane adaptation in phospholipids and cholesterol in the widely distributed, freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *J Comp Physiol B.* 3: 371-83

Roberts D., Tan-Sah V., Smith J. and Miyamoto S. (2013) Akt Phosphorylates HK-II at Thr-473 and Increases Mitochondrial HK-II Association to Protect Cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 288(33): 23798–23806

Ronges D., Walsh JP., Sinclair BJ. and Stillman JH. (2012) Changes in extreme cold tolerance, membrane composition and cardiac transcriptome during the first day of thermal acclimation in the porcelain crab *Petrolisthes cinctipes*. *J Exp Biol.* 215 (Pt 11): 1824-36

Safari F., Bayat G., Shekarfroush S., Hekmatimoghaddam S., Anvari Z., Moghadam MF. and Hajizadeh S. (2014) Expressional profile of cardiac uncoupling protein-2 following myocardial ischemia reperfusion in losartan- and ramiprilat-treated rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 15: 209-17

- Saito T., Ishiwata T., Hasegawa H., Nomoto S., Otokawa M. and Aihara Y. (2005) Changes in monoamines in rat hypothalamus during cold acclimation. *Journal of Thermal Biology* 30: 229–235
- Saitongdee P., Milner P., Becker D. L., Knight G.E. and Burnstock G. (2000) Increased connexin 43 gap junction protein in hamster cardiomyocytes during cold acclimatization and hibernation. *Cardiovasc. Res.* 47: 108–115
- Scott I. and Boulant J. (1984) Dopamine effects on thermosensitive neurons in hypothalamic tissue slices. *Brain Research.* 306: 157-163
- Selman C., McLaren J., Himanka M. and Speakman J. (2000) Effect of long – term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammal. *Free Radical Biology & Medicine.* 28: 1279-1285
- Semenza GL.(2013) HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest.* 123(9): 3664-71 Review
- Schulze P. (2009) Myocardial lipid accumulation and lipotoxicity in heart failure. *J Lipid Res.* 50(11): 2137–2138
- Sidossis L. and Kajimura S. (2015) Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest.* 125 (2): 478-86
- Sidossis LS., Porter C., Saraf MK., Børsheim E., Radhakrishnan RS., Chao T., Ali A., Chondronikola M., Mlcak R., Finnerty CC., Hawkins HK., Toliver-Kinsky T. and Herndon DN. (2015) Browning of Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans after Severe Adrenergic Stress. *Cell Metab.* 22 (2): 219–27
- Siems WG., Brenke R., Sommerburg O. and Grune T. (1999) Improved antioxidative protection in winter swimmers. *QJM.* 92 (4): 193-198
- Sluse FE. (2012) Uncoupling proteins: molecular, functional, regulatory, physiological and pathological aspects. *Adv Exp Med Biol.* 942: 137-56

- Soukup T., Zachařová G., Smerdu V. and Jirmanová I. (2001) Body, heart, thyroid gland and skeletal muscle weight changes in rats with altered thyroid status. *Physiological Research*. 50(6): 619–626
- Spanić M., Saičić Z., Buzadžić B., Korać B., Blagojević D and Petrović V. (1993) Effect of long-term exposure to cold on the antioxidant defense system in the rat. *Free Radical Biology & Medicine*. 15: 291-299
- Sun Z., Cade J., Fregly M. and Rowland E. (1997) Effect of chronic treatment with propranolol on the cardiovascular responses to chronic cold exposure. *Physiology & Behavior*. 62: 379–384
- Sun Z., Zhang Z. and Cade R. (2003) Renal responses to chronic cold exposure. *Can J Physiol Pharmacol*. 81: 22-7
- Šimečková M., Janský L., Lesná I. I., Vybíral S. and Srámek P. (2000) Role of beta adrenoceptors in metabolic and cardiovascular responses of cold exposed humans. *J Therm Biol*. 25: 437-442
- Teshima Y., Akao M., Jones SP. and Marbán E. (2003) Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res*. 93: 192 - 200
- Tipton MJ., Mekjavic IB. and Eglin CM. (2000) Permanence of the habituation of the initial responses to cold-water immersion in humans. *Eur J Appl Physiol*. 83 (1): 17-21
- Vergauwen L., Benoot D., Blust R. and Knapen D. (2010) Long-term warm or cold acclimation elicits a specific transcriptional response and affects energy metabolism in zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A* 157: 149–157
- Vucetic M., Otasevic V., Korac A., Stanic A., Jankovic A., Markelic M., Golic I., Velickovic K., Buzadzic B. and Korac B. (2011) Interacapsular brown adipose tissue metabolic reprogramming during cold acclimation: Interplay of HIF – 1 α and AMPK α . *Biochimica et Biophysica Acta*. 1810: 1252-1261

Vybíral S. and Janský L. (1974) Non-shivering thermogenesis in the golden hamster. *Physiol Bohemoslov.* 23: 235-43

Vybíral S. and Janský L. (1997) Hibernation triggers and cryogens: do they play a role in hibernation? *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 118: 1125 - 33 Review

White P. and Dauncey M.J. (1999) Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms is strikingly related to cardiac and skeletal muscle phenotype during postnatal development. *J. Mol. Endocrinol.* 23: 241- 254

Wulf A., Harneit A., Kröger M., Kebenko M., Wetzel MG. and Weitzel JM. (2008) T3-mediated expression of PGC-1alpha via a far upstream located thyroid hormone response element. *Mol Cell Endocrinol.* 287: 90–5

Wymann M. & Schneider R. (2008) Lipid signalling in disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 9: 162-176 Review

Xing Ji-Quing, Zhou Yang, Chen Jian - Feng, Li Shang – Bin, Fang Wei and Yang Jun (2014) Effect of cold adaptation on activities of relevant enzymes and antioxidant system in rats. *Int J Clin Exp Med.* 11: 4232-4237

Yano T., Fujioka D., Saito Y., Kobayashi T., Nakamura T., Obata JE., Kawabata K., Watanabe K., Watanabe Y., Mishina H., Tamaru S. and Kugiyama K. (2011) Group V secretory phospholipase A2 plays a pathogenic role in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 90(2): 335-43

Yüksel Ş., Asma D. (2006) Effects of extended cold exposure on antioxidant defense system of rat hypothalamic – pituitary – adrenal axis. *Journal of Thermal Biology.* 31: 313–317

Zhang H., Xue J., Zhang Z., Kong H., Liu A., Li S. and Xu D. (2015) Cold – inducible RNA – binding protein inhibits neuron apoptosis through the suppression of mitochondrial apoptosis. *Brain Research:* 1-10

Zhao Q., Gu D., Lu F., Mu J., Wang X., Ji X., Hu D., Ma J., Huang J., Li J., Chen J., Cao J., Chen CS., Chen J., Rice TK. and He J. (2015) Blood pressure reactivity to the cold

pressor test predicts hypertension among chinese adults: The GenSalt Study. *Am J Hypertens*.

Zhnag L., Zhang H., Zhu W., Li X. and Wang Z. (2012) Energy metabolism, thermogenesis and body mass regulation in tree shrew (*Tupaia belangeri*) during subsequent cold and warm acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 162: 437–442

10 Přílohová část

10.1 Přílohová část 1

Tabulka 1: Přehled hmotností potkanů a jednotlivých srdečních částí u zimní chronické adaptace 2014

Kontrola				
	BW[g]	RV[mg]	S[mg]	LV[mg]
C1	381	172	177	555
C2	443	173	194	568
C3	413	183	214	660
C4	414	223	145	550
C5	364	204	227	629
C6	372	209	187	623
Chronický chlad				
	BW[g]	RV[mg]	S[mg]	LV[mg]
CL1	289	178	101	657
CL2	328	221	176	635
CL3	327	201	178	623
CL4	333	200	159	586
CL5	349	198	195	671
CL6	326	186	197	606
CL7	337	185	170	679
CL8	319	196	125	787
CL9	291	209	170	623
CL10	362	177	181	604
Regrese				
	BW[g]	RV[mg]	S[mg]	LV[mg]
CLR11	312,5	144,4	155,8	555
CLR12	373,4	163,2	162,1	614
CLR13	382,2	200	192	624
CLR14	384,6	205,7	205	557
CLR15	398,6	162	200	581
CLR16	387,7	209	162	671

BW (*body weight*) – váha zvířete, RV (*right ventricle*) – pravá komora, S – septum, LV (*left ventricle*) – levá komora, C- kontrolní skupina chronické adaptace, CL- chronická skupina, CLR – regresní skupina

Tabulka 2: Přehled hmotností potkanů a jednotlivých srdečních částí u jarní chronické adaptace 2015

Kontrola							
	BW_[g]	RV_[mg]	S_[mg]	LV_[mg]	RV/BW	LV/BW	HW/BW
C8	398	174	148	545	0,437	1,369	2,178
C9	404	183	249	390	0,453	0,965	2,035
C1	418	223	291	502	0,533	1,201	2,431
C12	380	243	307	417	0,639	1,097	2,545
C15	446	194	233	584	0,435	1,309	2,267
Průměr	409,2	203,4	245,6	487,6	0,500	1,188	2,291
SD	24,682	28,815	62,304	82,621	0,088	0,162	0,202
Chronický chlad							
	BW_[g]	RV_[mg]	S_[mg]	LV_[mg]	RV/BW	LV/BW	HW/BW
CL22	343	172	177	453	0,501	1,321	2,338
CL21	397	173	194	613	0,436	1,544	2,469
CL20	390	183	214	527	0,469	1,351	2,369
CL19	373	223	145	477	0,598	1,279	2,265
CL18	386	204	227	581	0,528	1,505	2,622
Průměr	377,8	191	191,4	530,2	0,507	1,400	2,413
SD	21,324	22,034	32,192	67,522	0,062	0,117	0,138

BW (*body weight*) – váha zvířete, RV (*right ventricle*) – pravá komora, S – septum, LV (*left ventricle*) – levá komora, RV/BW- LV/BW- HW/BW-(srdeční indexy)C- kontrolní skupina chronické adaptace, CL- chronická skupina

Tabulka 3: Homogenizační tabulky s výpočtem hmotnosti srdeční tkáně

	číslo zvířete	ID vzorek	m1[g] (epp +kuličky +1ml RNAzol)	epp +kuličky +1ml RNAzol	m tkáň [mg] ((m2- m1)*1000)	doplnit RNAzol μl
Kontrola						
1	9	LV-K1	2,242	2,339	97	
2	6	LV-K2	2,268	2,370	102	
3	10	LV-K3	2,239	2,341	102	
4	7	LV-K4	2,254	2,355	101	
5	15	LV-K5	2,223	2,314	91	
6	4	LV-K6	2,220	2,323	103	
Chronický chlad						
7	15	LV-CL1	2,251	2,357	106	
8	14	LV-CL2	2,282	2,375	93	
9	13	LV-CL3	2,250	2,361	111	
10	17	LV-CL4	2,255	2,345	90	
11	18	LV-CL5	2,262	2,360	98	
12	16	LV-CL6	2,216	2,320	104	
13	11	LV-CL7	2,261	2,375	114	
14	20	LV-CL8	2,262	2,365	103	
15	21	LV-CL9	2,286	2,387	101	
16	22	LV-CL10	2,246	2,353	107	
Dvoutýdenní regrese						
17	1	LV-CLR11	2,252	2,344	92	
18	2	LV-CLR12	2,265	2,359	94	
19	3	LV-CLR13	2,277	2,376	99	
20	4	LV-CLR14	2,260	2,352	92	
21	5	LV-CLR15	2,232	2,310	78	
22	6	LV-CLR16	2,227	2,336	109	

LV-levá komora, C- kontrolní skupina chronické adaptace, CL- chronická skupina, CLR – regresní skupina

Tabulka 4: Záznam měření koncentrace RNA a výpočet množství RNA vstupující do reverzní transkripce (předtím 11)

vzorek č.	260/280	Sample ID	µg/µl (10x ředěno)	total µg/µl	kolik µl RNA do reakce (1µg)	µl H ₂ O
1	1,79	C1	0,059	0,59	1,7	4,3
2	1,66	C2	0,047	0,47	2,2	3,8
3	1,72	C3	0,061	0,61	1,6	4,4
4	1,72	C4	0,074	0,74	1,4	4,6
5	1,74	C5	0,051	0,51	2	4
6	1,73	C6	0,057	0,57	1,8	4,2
7	1,73	CL1	0,061	0,61	1,7	4,3
8	1,77	CL2	0,049	0,49	2,1	3,9
9	1,79	CL3	0,066	0,66	1,5	4,5
10	1,73	CL4	0,046	0,46	2,2	3,8
11	1,81	CL5	0,078	0,78	1,3	4,7
12	1,69	CL6	0,057	0,57	1,8	4,2
13	1,75	CL7	0,068	0,68	1,5	4,5
14	1,71	CL8	0,061	0,61	1,6	4,4
15	1,73	CL9	0,056	0,56	1,8	4,2
16	2,04	CL10	0,066	0,66	1,5	4,5
17	2,08	CLR11	0,06	0,6	1,7	4,3
18	1,87	CLR12	0,045	0,45	2,2	3,8
19	1,87	CLR13	0,047	0,47	2,1	3,9
20	2,01	CLR14	0,045	0,45	2,2	3,8
21	2,01	CLR15	0,046	0,46	2,2	3,8
22	1,94	CLR16	0,041	0,41	2,4	3,6

C- kontrolní skupina chronické adaptace, CL- chronická skupina, CLR – regresní skupina

10.2 Přílohová část 2

Tabulka 1: Přehled hmotností jednotlivých struktur a výpočet relativních hmotností (12 předtím)

Kontrola							
	BW[g]	RV[mg]	S[mg]	LV[mg]	RV/BW	LV/BW	HW/BW
C1	381	172	177	555	0,451	1,457	2,373
C2	443	173	194	568	0,391	1,282	2,111
C3	413	183	214	660	0,443	1,598	2,559
C4	414	223	145	550	0,539	1,329	2,217
C5	364	204	227	629	0,56	1,728	2,912
C6	372	209	187	623	0,562	1,675	2,739
Průměr	397,8	194	190,7	597,5	0,491	1,511	2,485
SM.ODCH.	11,3	7,8	10,8	17,1	0,027	0,069	0,115

BW (*body weight*) – váha zvířete, RV (*right ventricle*) – pravá komora, S – septum, LV (*left ventricle*) – levá komora, RV/BW- LV/BW- HW/BW (srdeční indexy), C- kontrolní skupina chronické adaptace, CL- chronická skupina, CLR – regresní skupina

Tabulka 2: Přehled hmotností jednotlivých struktur a výpočet relativních hmotností (13předtím)

Chronický chlad							
	BW[g]	RV[mg]	S[mg]	LV[mg]	RV/BW	LV/BW	HW/BW
CL1	289	178	101	657	0,616	2,273	3,239
CL2	328	221	176	635	0,674	1,936	3,146
CL3	327	201	178	623	0,615	1,905	3,064
CL4	333	200	159	586	0,601	1,76	2,838
CL5	349	198	195	671	0,567	1,923	3,049
CL6	326	186	197	606	0,571	1,859	3,034
CL7	337	185	170	679	0,549	2,015	3,068
CL8	319	196	125	787	0,614	2,467	3,473
CL9	291	209	170	623	0,718	2,141	3,443
CL10	362	177	181	604	0,489	1,669	2,657
Průměr	326,1	195,1	165,2	647,1	0,601	1,995	3,101
SM.ODCH.	8,8	5,4	11,7	22,3	0,025	0,093	0,096

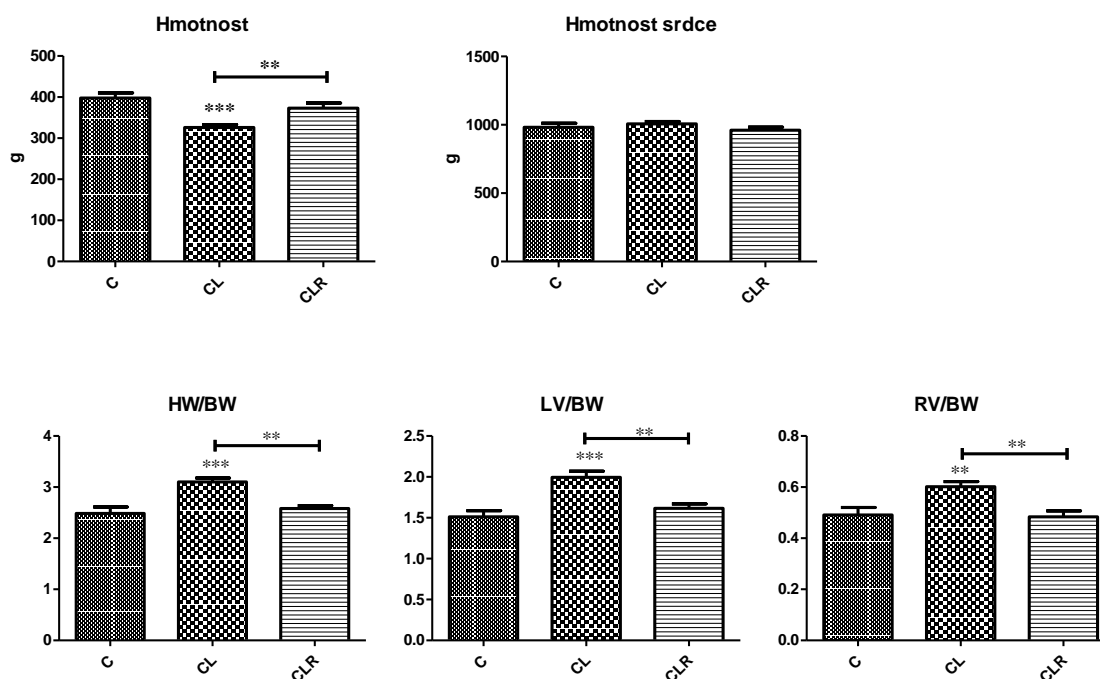
BW (*body weight*) – váha zvířete, RV (*right ventricle*) – pravá komora, S – septum, LV (*left ventricle*) – levá komora, RV/BW- LV/BW- HW/BW-(srdeční indexy), C- kontrolní skupina chronické adaptace, CL- chronická skupina, CLR – regresní skupina

Tabulka 3: Přehled hmotností jednotlivých struktur a výpočet relativních hmotností (14 předtim)

Regrese							
	BW[g]	RV [mg]	S [mg]	LV [mg]	RV/BW	LV/BW	HW/BW
CLR11	312,5	144,4	155,8	555	0,462	1,776	2,737
CLR12	373,4	163,2	162,1	614	0,437	1,644	2,516
CLR13	382,2	200	192	624	0,523	1,633	2,658
CLR14	384,6	205,7	205	557	0,535	1,448	2,516
CLR15	398,6	162	200	581	0,406	1,458	2,366
CLR16	387,7	209	162	671	0,539	1,731	2,688
Průměr	373,2	180,7	179,5	600,3	0,484	1,615	2,58
SM.ODCH.	11,5	10,2	8,2	16,7	0,021	0,051	0,052

BW (*body weight*) – váha zvířete, RV (*right ventricle*) – pravá komora, S – septum, LV (*left ventricle*) – levá komora, RV/BW- LV/BW- HW/BW-(srdeční indexy) C- kontrolní skupina chronické adaptace, CL- chronická skupina, CLR – regresní skupina

Obrázek 82: Grafické vyjádření tabulek 1 – 3



10.3 Přílohová část 3

Tabulka 1: Příjem vody za 24 hodin u kontrolní skupiny bez neomezené dostupnosti vody

Kontrola bez neomezené dostupnosti vody		
číslo potkana	voda [ml]	moč [ml]
10	20,5	12,75
9	13,5	12,4
29	16,5	10
23	25	17
15	20	14,5
3	10	7
2	15	16
25	25	13,5
27	25	9,5
29	30	17
30	28	20
21	10	14
22	24	22,5
23	25	17
24	27	19
Průměr	20,967	14,81
SD	6,518	4,177

Tabulka 2: Příjem vody za 24 hodin u kontrolní skupiny s omezenou dostupností vody

Kontrola s omezenou dostupností vody		
číslo potkana	voda [ml]	moč [ml]
16	1,2	7,25
21	1,5	9,8
11	7	10
24	6	9
26	3	10
28	7	5
20	7	10,5
Průměr	4,671	8,793
SD	2,675	1,985

Tabulka 3: Příjem vody za 24 hodin u chronicky adaptovaných potkanů s neomezenou dostupností vody

CHLAD bez neomezené dostupnosti vody		
číslo potkana	voda [ml]	moč [ml]
9	15,5	21,5
17	10	14
12	30	35
25	25	35
Průměr	20,125	26,375
SD	9,04	10,419

Tabulka 4 : Příjem vody za 24 hodin u chronicky adaptovaných potkanů s omezenou dostupností vody

CHLAD s omezenou dostupností vody		
číslo potkana	voda [ml]	moč [ml]
27	0,5	6
5	0	13
23	0	6,5
7	0,5	7
1	0	7
30	5	11
29	5	10
16	2	12,5
Průměr	1,625	9,125
SD	2,184	2,838

Tabulka 5: Příjem vody za 24 hodin u chronicky adaptovaných potkanů, kteří byli 1 den v teple bez ztížené dostupnosti vody

CHLAD 1 den v teple bez neošmezené dostupnosti vody		
číslo potkana	voda [ml]	moč [ml]
5	13	21
8	20	18
3	10	13,5
4	22	24
10	12	13
Průměr	16,25	19,125
SD	5,888	5,105

Tabulka 6: Příjem vody za 24 hodin u chronicky adaptovaných potkanů, kteří byli 1 den v teple s omezenou dostupností vody

CHLAD 1 den v teple s omezenou dostupností vody		
číslo potkana	voda [ml]	moč [ml]
6	2	6
7	2	7,5
2	5	7
Průměr	3	6,833
SD	1,732	0,764

Tabulka 7: Poměr vypité vody a vyloučené moči

Poměr vypité vody a vyloučené moči					
K	CL	CLR	Ko	Clo	CLRo
1,607843	0,72093	0,619048	0,165517	0,083333	0,333333
1,08871	0,714286	1,111111	0,153061	0	0,266667
1,65	0,857143	0,740741	0,7	0	0,714286
1,470588	0,714286	0,916667	0,666667	0,071429	
1,37931		0,923077	0,3	0	
1,428571			1,4	0,454546	
0,9375			0,666667	0,5	
1,851852				0,16	
2,631579					
1,764706					
1,4					
0,714286					
1,066667					
1,470588					
1,421053					

Tabulka 8a: Výsledková tabulka diagnostiky potkaní moči

Diagnostika moči			Dusitany	Urobilinogen [mg/dl]	Bílkoviny [mg/dl]	pH	Krev	Specifická hmotnost	Ketony [mg/dl]	Glukóza [mg/dl]
Druh adaplace	ID	Leukocyty								
Kontrola	11	Negativní	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Kontrola	24	Negativní	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Kontrola	16	Stopa	Pozitivní	0,2	Stopa	8	Negativní	1,03	Negativní	Negativní
Kontrola	10	Stopa	Pozitivní	0,2	Stopa	8	Negativní	1,03	Negativní	Negativní
Kontrola	9	Negativní	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Kontrola	29	Negativní	Pozitivní	1	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Kontrola	20	Stopa	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Kontrola	21	Negativní	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Kontrola	22	Negativní	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Kontrola	23	Negativní	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Kontrola	24	Negativní	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní

Tabulka 8b: Výsledková tabulka diagnostiky potkaní moči

Diagnostika moči			Dusitany	Urobilinogen [mg/dl]	Bílkoviny [mg/dl]	pH	Krev	Specifická hmotnost	Ketony [mg/dl]	Glukóza [mg/dl]
Druh adaptace	ID	Leukocyty								
Chlad	25	Stopa	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Chlad	27	Stopa	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Chlad	28	Stopa	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Chlad	29	Stopa	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Chlad	30	Stopa	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Chlad	1	Negativní	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Chlad	27	Stopa	Pozitivní	0,2	30	8	Velké množství	1,03	Negativní	Negativní
Chlad	9	Stopa	Pozitivní	0,2	Stopa	8	Negativní	1,03	Negativní	Negativní
Chlad	23	Negativní	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1,03	Negativní	Negativní
Chlad	1	Stopa	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Chlad	2	Stopa	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Chlad	3	Stopa	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Chlad	4	Stopa	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
Chlad	10	Stopa	Negativní	0,2	Stopa	8	Negativní	1	Negativní	Negativní
1 den v teple	5	Negativní	Pozitivní	0,2	Stopa	8	Negativní	1,03	Negativní	Negativní
1 den v teple	6	Negativní	Pozitivní	0,2	Stopa	8	Negativní	1,03	Negativní	Negativní
1 den v teple	7	Negativní	Pozitivní	0,2	Stopa	8	Negativní	1,03	Negativní	Negativní
1 den v teple	8	Negativní	Pozitivní	0,2	Stopa	8	Negativní	1,03	Negativní	Negativní